WISSENSCHAFTLICHE ZEITSCHRIFT DER HUMBOLDT-UNIVERSITÄT ZU BERLIN

Mathematisch-Naturwissenschaftliche Reihe

Als Manuskript gedruckt

Jg. VI (1956/57) Nr. 5

(Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Humboldt-Universität zu Berlin, Direktor: Nationalpreisträger Prof. Dr. F. JUNG)

Untersuchungen über die Methämoglobinrückbildung und über die Aldehyddehydrase in kernlosen Erythrozyten*

Von HANSJÜRGEN MATTHIES

INHALT

1. Einleitung
2. Die Bedeutung der Methämoglobinrückbildung in Erythrozyten
   2.1 Die Autooxydation des Blutfarbstoffes
   2.2 Der physiologische Methämoglobingehalt des Blutes
   2.3 Die energieliefernden Prozesse in Erythrozyten
   2.4 Die Methämoglobinrückbildung in Erythrozyten
3. Die Wirkung von Formaldehyd auf Erythrozyten
4. Die Wirkung von Aldehyden auf die Methämoglobinrückbildung in kernlosen Erythrozyten
5. Über die Eigenschaften einer Aldehyddehydrase in kernlosen Erythrozyten
6. Besprechung der Ergebnisse
7. Methodik
8. Abkürzungen
9. Verzeichnis der Abbildungen
10. Literatur

1. Einleitung

Am Institut für Pharmakologie der Berliner Universität ist das Problem der toxischen Methämoglobinämie ein traditionelles Arbeitsthema geworden, seit vor über zwanzig Jahren HEUBNER anläßlich einer Reihe von Intoxikationen durch methämoglobinbildende Stoffe in der chemischen Industrie die eingehende Bearbeitung dieser Frage in Angriff genommen hatte. Mit einer kurzen, durch die Kriegs- und Nachkriegsereignisse bedingten Unterbrechung wird seit dieser Zeit an diesem Thema gearbeitet, das sich inzwischen zu einem großen Komplex von Fragestellungen entwickelt hat. Einen Aufschwung nahm die Forschungsarbeit nicht zuletzt auch dank der großzügigen Maßnahmen der Regierung der Deutschen Demokratischen Republik, die den Wiederaufbau des durch den Krieg völlig zerstörten Instituts für Pharmakologie und Toxikologie der nunmehr Humboldt-Universität genannten Berliner Universität unter dem Direktorat von Prof. Dr. F. JUNG ermöglichte. Darüber hinaus wurde die Durchführung der experimentellen Untersuchungen durch die Bereitstellung von Mitteln im Rahmen der staatlichen Forschungsaufträge gewährleistet.

Die Weiterführung der damals von HEUBNER begonnenen Arbeiten erfolgte vor allem zunächst in zwei Richtungen: Einmal wurde den chemischen Reaktionen der toxischen Substanzen mit dem Blutfarbstoff besondere Aufmerksamkeit geschenkt. Diese Problematik, der auch HEUBNER selbst seine eigentlichen Interessen widmete, wurde vor allem von JUNG und KIESE bearbeitet. In neuerer Zeit haben sich daraus jene Arbeiten entwickelt, die sich mit der physikalischen Chemie der Hämoproteide und der Aufklärung ihrer funktionellen und strukturellen Eigenschaften befassen und die von JUNG und SCHELER am Institut für Medizin und Biologie der Deutschen Akademie der Wissenschaften durchgeführt werden. Die andere Richtung, in der die Untersuchung der Methämoglobinämie weiter vorangetrieben wurde, war die Aufklärung der Stoffwechselvorgänge, welche die Schädigung durch die Methämoglobinbildner wieder rückgängig machen. Sie wurde am Berliner Institut durch KIESE eingeleitet und durch JUNG und MATTHIES am gleichen Institut weitergeführt.

Bei diesen Arbeiten zeigte sich sehr bald, daß eine wirkliche Deutung der in toxikologischer Hinsicht interessierenden Vorgänge nur möglich ist, wenn ihr eine gute Kenntnis der normalen Stoffwechselvorgänge im Erythrozyten zugrunde liegt, wobei der normalen Methämoglobinrückbildung als der spezifischen Stoffwechselleistung der roten Blutzelle natürlich besondere Bedeutung zukommen muß. Aus diesem Grunde wurden in den letzten Jahren eine Reihe von Untersuchungen durchgeführt, die von diesem Gesichtspunkt aus zu betrachten sind und die zunächst nur mittelbar mit dem Hauptproblem in Verbindung stehen. Ohne die toxikologische Seite der Fragestellung aus den Augen zu verlieren, mußte also eine Reihe von Fragen der Physiologie der Erythrozyten bearbeitet werden, die gleichzeitig auch von allgemeinerer Bedeutung sind.

2. Die Bedeutung der Methämoglobinrückbildung in Erythrozyten

In dem Maße, in dem es während der phylogenetischen Entwicklung des Tierreichs zum Zusammenschluß einzelner Zellen zu vielzelligen Organismen und zur Differenzierung der Zellelemente kam, mußte es auch zur Entwicklung neuer Formen des Nährstoff- und Schlackentransports kommen. Durch einfache Diffusion war der Austausch dieser Substanzen zwischen allen

* Von der Medizinischen Fakultät der Humboldt-Universität zu Berlin 1957 als Habilitationsschrift angenommen.

Habil: 22.5.58

1958

Teilen des Organismus und der Umwelt nicht mehr möglich. Die Bildung von Lymph- und Kreislaufsystemen ist mit der Höherentwicklung der vielzelligen Organismen also untrennbar verbunden.

Besondere Bedeutung kommt diesem Problem im Hinblick auf den Sauerstofftransport zu. Die Wasserlöslichkeit des Sauerstoffs ist nur gering und wird durch die Anwesenheit der Salze des physiologischen Milieus noch weiter vermindert. Wir finden deshalb bei verhältnismäßig niederen Tieren, wie den Anneliden, eine qualitativ neue Form des Sauerstofftransports durch Vermittlung der Blutfarbstoffe. Diese besitzen die Eigenschaft, den Sauerstoff je nach dem herrschenden Partialdruck dieses Gases locker zu binden oder wieder abzugeben. Während am Anfang dieser Entwicklung der Blutfarbstoff noch frei in der Kreislaufflüssigkeit gelöst ist, wie bei den meisten Wirbellosen, findet er sich bei den Wirbeltieren in besonderen Zellen, den Chromozyten. Der Blutfarbstoff ist bei vielen Avertebraten eisenhaltig, ebenso wie bei den Vertebraten. Bei einigen Mollusken, Arachnoiden und Krustazeen ist er kupfer- oder vanadiumhaltig. Während die Chromozyten der niederen Klassen der Vertebraten kernhaltig sind, finden wir bei den entsprechenden Zellen der Säugetiere im ausgereiften Zustand keine Zellkerne mehr. Der Blutfarbstoff der kernlosen Säugetiererythrozyten ist das Hämoglobin, wegen seiner roten Farbe werden die Zellen auch Erythrozyten, rote Blutkörperchen, genannt.

2.1 Die Autoxydation des Blutfarbstoffes

Das Hämoglobin ist ein Chromoproteid mit Globin als Eiweißanteil und dem Häm als prosthetischer Gruppe. Das Häm ist ein Komplex eines Eisenatoms mit einem 1,3,5,8-Tetramethyl-6,7-dipropionsäure-2,4-divinyl-porphyrin. Jedes Hämoglobinmolekül enthält vier prosthetische Gruppen. Wenn das Hämoglobin keinen Sauerstoff gebunden hat, sieht es blaurot bis violett aus und besitzt ein charakteristisches Absorptionsmaximum bei 566 mμ. Ist dagegen molekularer Sauerstoff an die Häm-Gruppen angelagert, so hat die Verbindung eine hellrote Farbe mit zwei Banden bei 577 und 540 mμ. Diese beiden Formen des Blutfarbstoffs stellen seine in physiologischer Hinsicht funktionsfähigen Zustände dar, die in einem vom Sauerstoffpartialdruck und einer Reihe untergeordneter Faktoren abhängigen Gleichgewicht stehen.

Daneben gibt es aber auch eine Form des Blutfarbstoffs, in der das zentrale Eisenatom nicht wie bei den erstgenannten zweiwertig, sondern dreiwertig vorliegt. Sie muß deshalb als echtes Oxydationsprodukt des Hämoglobins angesehen werden und wird Methämoglobin genannt. Sie hat eine braune Farbe.

Daß es sich tatsächlich um eine einstufige Oxydation bei dem Übergang vom Hämoglobin zum Methämoglobin handelt, wurde durch die Freisetzung des Sauerstoffs aus dem oxygenierten Hämoglobin durch Titration mit Ferrizyanid bewiesen, wobei jedes Mol Ferrizyanid ein Äquivalent Hämoglobin zu Methämoglobin oxydiert, das nicht mehr in der Lage ist, den Sauerstoff reversibel zu binden (128; 154). Den umgekehrten Reaktionsablauf benutzten Hill und Holden (73), wobei sie zu dem gleichen Ergebnis kamen, wenn sie Methämoglobin mit alkalischem Ferrotartrat titrierten. Die oxydierte und die reduzierte Form des Blutfarbstoffs sind ineinander überführbar, ohne daß dadurch die Fähigkeit der Ferro-Form, molekularen Sauerstoff reversibel anzulagern, nennbar verändert wird. Diese Feststellung ist für die späteren Ausführungen von Bedeutung.

Die Bildung von Methämoglobin kann auf verschiedene Weise erfolgen: Durch Autoxydation an molekularem oder aktiviertem Sauerstoff oder durch Einwirkung von Oxydationsmitteln. Beide Möglichkeiten sind unter physiologischen Bedingungen denkbar, im Vordergrund steht aber, wahrscheinlich wegen der ständigen Gegenwart des Sauerstoffs im zirkulierenden Blut, die Autoxydation.

Es läßt sich leicht zeigen, daß gelöstes Hämoglobin in Sauerstoffgegenwart langsam in Methämoglobin umgewandelt wird. Unter Sauerstoffabschluß ist es hingegen beständig. Diese Umwandlung findet nicht nur in Lösung, sondern anscheinend auch in der kristallinen Form statt (60; 61; 65). Den Vorgang der Autoxydation untersuchte Brooks (20; 21) eingehender und fand als Geschwindigkeitskonstante für die Methämoglobinbildung in Hämolysaten aus Rindererythrozyten bei 25° C, p_H 7,04 und in Gegenwart von atmosphärischer Luft $k = 0{,}34 \cdot 10^{-2}$/h. Dazu muß aber bemerkt werden, daß in einem Vollhämolysat keine reine Hämoglobinlösung vorliegt. Insofern ist dieser Wert sehr problematisch. Er kann zu groß oder auch zu klein sein, je nachdem, ob bei der Hämolyse Substanzen frei oder wirkungslos werden, welche die Oxydation entweder beschleunigen oder ihr entgegenwirken. Daß solche Substanzen vorhanden sind, geht aus den Befunden von Zipf (210) hervor, wonach in verdünnten Hämolysaten die Methämoglobinbildung schneller verläuft als in konzentrierten. Möglicherweise werden oxydationshemmende Substanzen nur in stärkeren Konzentrationen wirksam. So werden in einer 3%igen Hämoglobinlösung in 24 Stunden nur 12% Methämoglobin gebildet, in einer 0,5%igen im gleichen Zeitraum aber 50%. Holden (78) kam zu der Vermutung, daß vor allem das in den Erythrozyten befindliche reduzierte Glutathion für die Hemmung der Methämoglobinbildung in konzentrierten Hämolysaten verantwortlich zu machen sei. Fegler (45) beschäftigte sich ebenfalls mit diesem Problem. Er untersuchte die Konstanten der Methämoglobinbildung in den Hämolysaten verschiedener Tierarten, und zwar in Vollhämolysaten wie auch in weitgehend stromafreien Zellinhalten von Erythrozyten. Dabei zeigten sich deutliche Unterschiede zwischen den verschiedenen Tierarten, aber auch bei den einzelnen Tieren zwischen dem stromafreien und dem Vollhämolysat. Aus den Ergebnissen dieser und einer späteren Arbeit zusammen mit Eggleton (42) kommt er ebenfalls zu dem Schluß, daß es das Glutathion sei, das als „Stromafaktor" die Methämoglobinbildung in Hämolysaten hemmt.

Unabhängig von solchen komplizierenden Faktoren kann aber die Beobachtung von Hoppe-Seyler, die zur Entdeckung des Methämoglobins und zu seiner Namensgebung geführt hat, in ihrem Prinzip aufrechterhalten werden: Hämoglobin wandelt sich bei Sauerstoffgegenwart in Methämoglobin um (79; 80).

2.2 Der physiologische Methämoglobingehalt des Blutes

Aus der Tatsache, daß Hämoglobin in Gegenwart von Sauerstoff nicht beständig ist, sondern sich langsam zu Methämoglobin oxydiert, müßte man eigentlich folgern, daß im Kreislauf der gesamte Blutfarbstoff als Methämoglobin vorliegt. In Wirklichkeit ist aber der Gehalt des strömenden Blutes an Methämoglobin so gering, daß er zunächst der Aufmerksamkeit der Untersucher überhaupt entgangen ist. Erst durch Verfeinerung der

R. UNIV. BIBLIOTHEEK LEIDEN

manometrischen Methoden, vor allem aber durch die Einführung spektrophotometrischer Bestimmungen (44; 62) konnten die niedrigen Konzentrationen von Methämoglobin neben Hämoglobin im Blut ermittelt werden. Cox und Wendel (31) lehnten noch die Anwesenheit von nachweisbaren Mengen Methämoglobin im Blut ab. Aber schon bei Anwendung exakter manometrischer Methoden konnte festgestellt werden, daß ein bestimmter Prozentsatz des Blutfarbstoffes von sogenanntem „inaktivem Hämoglobin" gebildet wird, das weder Kohlenmonoxyd noch Sauerstoff zu binden vermag (8; 95; 96; 147; 155; 185). Die angegebenen Prozentzahlen inaktiven Hämoglobins zeigen bei den verschiedenen Autoren beträchtliche Differenzen, sie liegen außerdem in der Regel höher als die spektroskopisch gefundenen Methämoglobinwerte (62, 63, 68; 70, 135, 185). In der Arbeit von Heubner und Mitarbeitern (70) wurden unter Vermeidung der Fehler früherer Untersuchungen folgende Durchschnittswerte für verschiedene Tierarten gefunden:

Katze	1,1%	Methämoglobin
Hund	0,9%	„
Ratte	0,8%	„
Mensch	0,7%	„
Meerschweinchen	0,2%	„
Kaninchen	0,2%	„

Jung und Kuon (92) benutzten eine andere Methode zum Nachweis des Methämoglobins im Blut. Bekanntlich kann Methämoglobin den Zerfall des Chlorations katalytisch beschleunigen. Aus der Kinetik der Umsetzung von Chlorat mit Blut bestimmten die Autoren den initialen Gehalt an Methämoglobin. Sie wiesen aber darauf hin, daß die erhaltenen Werte wegen der Unübersichtlichkeit der Reaktion vorsichtig zu beurteilen seien. Das Vorhandensein von Methämoglobin im Blut kann jedoch auch mittels dieser Methode als bewiesen gelten. Van Slyke und Mitarbeiter (185) kommen auf Grund ihrer vergleichenden Bestimmungen mittels manometrischer und spektrophotometrischer Methoden zu dem Schluß, daß das inaktive Hämoglobin nicht nur vom Methämoglobin gebildet wird. Das Problem dieses „inaktiven Hämoglobins" scheint bis jetzt noch nicht befriedigend gelöst zu sein.

Die niederen Methämoglobinkonzentrationen, wie sie nach diesen Untersuchungen in Wirklichkeit im Blut vorliegen, erfordern bei Berücksichtigung der Autoxydierbarkeit des Hämoglobins die Annahme von Mechanismen, die den Blutfarbstoff vor einer Oxydation schützen. Theoretisch wären verschiedene Möglichkeiten denkbar, die diese Forderung erfüllen würden.

Zunächst könnte man annehmen, daß das Hämoglobin in freier Lösung anders reagiert als in der intakten Zelle. Dazu ist aber zu sagen, daß in gut serumfrei gewaschenen Zellen bei Inkubation in Sauerstoffgegenwart ebenfalls eine Zunahme des Methämoglobins beobachtet werden kann.

Weiterhin wäre denkbar, daß im Blut — das heißt in den Zellen selbst oder im Serum — Stoffe vorhanden sind, die der Oxydation des Blutfarbstoffs entgegenwirken. Wie schon erwähnt, denken Holden (78) sowie Fegler und Eggleton (42, 45, 46) in diesem Zusammenhang an das Glutathion, von dem ja eine beträchtliche Menge, etwa 70 mg%, in den Erythrozyten vorhanden ist (139). Das reduzierte Glutathion vermag in direkter Reakion das Methämoglobin zu reduzieren. Die Reduktion des Glutathions könnte dann wieder durch TPN·H erfolgen (124), die Hydrierung dieses Nukleotids erforderte aber doch einen enzymatischen Prozeß innerhalb der Erythrozyten. Ohne solche Vorgänge im Zellinnern wäre aber noch eine andere Möglichkeit der Methämoglobinreduktion denkbar, und zwar durch Askorbinsäure. Eine direkte Reduktion des Methämoglobins durch diese Substanz ist möglich, allerdings nur bei verhältnismäßig hohen Konzentrationen der Reaktionspartner (49, 186). Nun ist aber die Erythrozytenmembran nur sehr wenig durchlässig für Askorbinsäure (52), so daß eine extraerythrozytäre Reduktion der Askorbinsäure nach ihrer Oxydation durch Methämoglobin zu Dehydroaskorbinsäure kaum in Betracht kommt. Auch Kiese (100) konnte keine Reduktion des intraerythrozytären Methämoglobins nach Zugabe von Askorbinsäure zu einer Erythrozytensuspension feststellen. Dennoch wird immer wieder über therapeutische Erfolge mit Askorbinsäure bei der Therapie von Methämoglobinämien berichtet (176a).

Bei Betrachtung der bisher erörterten Möglichkeiten eines Schutzes des Blutfarbstoffes gegen die Oxydation ergibt sich also die Notwendigkeit, nach Reduktionssystemen innerhalb der Erythrozyten zu suchen, die der Autoxydation entgegenwirken. Der physiologische Methämoglobingehalt des Blutes wäre dann als die Gleichgewichtseinstellung zwischen Autoxydation und intraerythrozytärer Reduktion des Blutfarbstoffes aufzufassen. Die Artspezifitäten des physiologischen Methämoglobingehalts, wie sie in der Tabelle S. 491 zum Ausdruck kommen, könnten dann als Folge der unterschiedlichen Oxydationsgeschwindigkeiten der verschiedenen Hämoglobine angesehen werden, wenn man sich auf die Werte von Fegler (45) verlassen könnte. Bei der Unzuverlässigkeit dieser Angaben — wurden sie doch an Hämolysaten ermittelt — ist diese Annahme zumindest fraglich. Die andere Deutungsmöglichkeit ist die Annahme unterschiedlicher Geschwindigkeiten der Methämoglobinreduktion in den verschiedenen Erythrozytenarten. Darüber bestehen in der Literatur zuverlässigere Angaben, wenn auch verstreut und zumeist unter verschiedenen Versuchsbedingungen gewonnen. Sie sind deshalb nicht ohne weiteres vergleichbar. Im Rahmen der vorliegenden Untersuchung war es notwendig, zuverlässiges und gut vergleichbares Zahlenmaterial zu besitzen, weshalb an verschiedenen Haus- und Laboratoriumstieren die Werte erneut bestimmt wurden (S. 499). Es sei hier noch erwähnt, daß das physiologische Methämoglobin nicht gleichmäßig über alle Zellen einer Erythrozytenpopulation verteilt ist. Jung (91) führt dafür eine Reihe von Belegen an. Danach muß man annehmen, daß mit zunehmendem Alter der Methämoglobingehalt der Zellen zunimmt. Vergleichende Untersuchungen an Retikulozyten und reifen Erythrozyten konnten diese Annahme bestätigen (119).

Die recht niedrigen Methämoglobinkonzentrationen in dem strömenden Blut lassen bei der nicht allzu niedrigen Geschwindigkeit der Autoxydation auf sehr aktive Reduktionsmechanismen schließen. Das Auftreten von unphysiologisch hohen Methämoglobinkonzentrationen kann durch Störung der normalen Reduktionsvorgänge oder durch Beschleunigung der Oxydationsprozesse erklärt werden.

Auf jeden Fall kommt es dann zu einer Beeinträchtigung der Sauerstofftransportfunktion des Blutes, zu einer Verschlechterung der Sauerstoffversorgung der Gewebe und allen sich daraus ergebenden Konsequenzen für den Gesamtorganismus. Die Aufklärung der Methämoglobinbildungs- und Rückbildungsvorgänge sowie ihrer Beeinflußbarkeit erhält damit klinische Bedeutung.

2.3 Die energieliefernden Prozesse in Erythrozyten

Die Glykolyse und die Atmung sind als die grundlegenden energieliefernden Prozesse in tierischen Organismen anzusehen. Der Energiegewinn bei dem intermediären Abbau der Substrate kommt vor allem in der Bildung von energiereichen Phosphatbindungen zum Ausdruck. Von diesem Gesichtspunkt aus betrachtet, erfolgt die Ausnutzung der chemischen Energie der Glukose durch die Atmung viel gründlicher als durch die Glykolyse. Während bei dem glykolytischen Abbau der Glukose zu Milchsäure höchstens zwei energiereiche Phosphatbindungen je Molekül Glukose entstehen können, beträgt bei der vollständigen Verbrennung zu CO_2 und H_2O über die Atmungskette der Gewinn etwa 36 energiereiche Bindungen je Molekül Glukose. Diese Feststellung ist insofern von Bedeutung, da allzu häufig der Begriff „Atmung" für jede Form des Sauerstoffverbrauchs in biologischen Systemen verwandt wird, auch wenn damit kein wesentlicher Energiegewinn für den Organismus verbunden ist.

Wenn man den Sauerstoffverbrauch der kernlosen Erythrozyten betrachtet, so ist dieser vergleichsweise sehr klein. Die Werte, die in der Literatur angegeben werden, schwanken etwas, in Abhängigkeit von dem Ausmaß der Leukozyten- und Blutplättchenabtrennung sowie von der Berücksichtigung des Retikulozytengehalts der untersuchten Proben. Michaelis und Salomon (127) lehnen überhaupt einen Sauerstoffverbrauch der Erythrozyten ab, während Wright (208) einen eben meßbaren Sauerstoffverbrauch feststellen konnte. Ramsay und Warren bestimmten die Sauerstoffzehrung reifer Kaninchenerythrozyten durch Extrapolation aus den Werten, die sie an Proben mit unterschiedlichem Retikulozytengehalt gemessen hatten. Sie errechneten auf diese Weise einen Sauerstoffverbrauch von 8,44 µl/g frischen Zellen × h. E. Jacobsen und Plum (88) konnten ebenfalls eine schwache Sauerstoffaufnahme reifer Erythrozyten feststellen. Die Tabelle S. 492 gibt einen Überblick über die von den verschiedenen Autoren gefundenen Werte. Daraus geht hervor, daß der Q kernloser reifer Erythrozyten den Wert von 0,06 in keinem Fall übersteigt, im Durchschnitt aber etwa 0,02 beträgt. Diesen äußerst geringen Wert kann man überdies nicht einmal als Atmung bezeichnen, da mit oxydativen Vorgängen gerechnet werden kann, die nicht mit einem entsprechenden Energiegewinn verbunden sind. So könnte die Autoxydation durchaus einen beträchtlichen Teil des Sauerstoffverbrauchs erklären. Auch die beobachtete Kohlendioxydfreisetzung ist noch kein Beweis für eine intakte Atmung, da sie auch durch andere Vorgänge erklärt werden könnte, beispielsweise durch die Wasserstoffionenbildung im Verlauf der Glykolyse.

Offensichtlich spielt also die Atmung in den kernlosen Erythrozyten eine untergeordnete Rolle, wenn sie überhaupt vorhanden ist. Die notwendige Energie für die Aufrechterhaltung der Funktionen dieser Zellart wird demnach ausschließlich durch den glykolytischen Abbau der Glukose bestritten, und in der Tat wird die von Erythrozytensuspensionen verbrauchte Glukose zum größten Teil als Milchsäure wiedergefunden (199). In der Tabelle S. 492 sind auch die Werte für die Glykoserate menschlicher Erythrozyten zusammengestellt. Auch diese Zahlen sind nicht sehr groß, weshalb man ja auch lange Zeit der Meinung war, daß die roten Blutzellen nach ihrer Reifung nicht mehr als lebende Zellen anzusehen sind. Man muß aber berücksichtigen, daß der größte Teil der Zellsubstanz, auf die ja bei der Errechnung der Stoffwechselwerte bezogen wird, aus Hämoglobin besteht, daß also die eigentlichen Stoffwechselenzyme sich mit einem sehr geringen Prozentsatz am Gesamtgewicht beteiligen. Die für die vollständige Glykolyse notwendigen Fermente sind bereits alle im Erythrozyten nachgewiesen worden; Tabelle S. 493 gibt einen Überblick über die in neuerer Zeit durchgeführten Untersuchungen.

Stoffwechselgrößen der kernlosen Erythrozyten

Art	Q_{O_2}	Verfasser	
Menschliche Erythrozyten	— 0,015	Warburg, O.	(189)
	— 0,017	Harrop, G. A. u. G. S. A. Barron	(58)
	— 0,06	Ramsay, R. u. C. O. Warren	(145)
	— 0,042	Damble, K.	(32)
Kaninchenerythrozyten	— 0,049	Warburg, O.	(189)
	— 0,022	Ramsay, R. u. C. O. Warren	(146)
Kernlose Erythrozyten	— 0,02	Denstedt, O. F.	(34)
	— 0,05	Granick, S.	(54)
Zum Vergleich:			
Skeletmuskulatur	— 10,0	Lang, K.	(107a)
Herzmuskulatur	— 20,0	Lang, K.	(107a)
	$Q_G^{O_2}$		
Menschliche Erythrozyten	0,25	Engelhardt, N. u. M. Ljubimowa	(43)
	0,15	Somogyi, M.	(178)
	0,228	Bartlett, G. R. u. A. A. Marlow	(13)
	0,30	Schmitz, H. u. C. Glover	(163)
	0,25	Bird, R. M.	(15)

Im Gegensatz dazu ist es nicht gelungen, alle Enzyme für ein vollständiges Atmungssystem nachzuweisen. Zwar konnte eine aktive Fumarase und Malatdehydrase gefunden werden (142, 179), aber weder Bernsteinsäuredehydrase noch andere Enzyme des Tricarbonsäurezyklus ließen sich nachweisen. Auch für die Zytochromoxydase ist das gleiche zu sagen; sie konnte allerdings in Retikulozyten gefunden werden, die ja auch eine Atmung zeigen, und bei denen sich auch verschiedene andere Atmungsfermente bestimmen ließen (157). Die Glykolyse in den kernlosen Erythrozyten weist nun noch eine Besonderheit gegenüber dem gleichen Stoffwechselsystem in anderen Körperzellen auf, worüber von Rapoport in einer Reihe von Arbeiten berichtet wurde. Danach wird der größte Teil der phosphorylierten Intermediärprodukte der Glykolyse in kernlosen Erythrozyten von der 2,3-Diphosphoglyzerinsäure gestellt (55). Ungeachtet der Tatsache, daß es sich um eine sehr stabile Verbindung handelt, ist sie doch in den glykolytischen Stoffwechsel einbezogen, wie die weiteren Untersuchungen beweisen konnten (71, 148, 149, 150, 153). Die Bedeutung dieser Stoffwechselbesonderheit ist nach Rapoport in der Möglichkeit zu sehen, organisches Phosphat abzuspalten, ohne daß es zur Rephosphorylierung von ADP zu ATP kommt. Auf diese Weise soll der Erythrozyt in der Lage sein, auch bei geringem Verbrauch von energiereichem Phosphat die Glykolyse so zu steuern, daß der notwendige Durchsatz von Glucose zur Hydrierung der Pyridinnukleotide erreicht wird. Über die Dehydrierung der Substrate in den Erythrozyten bestehen recht klare Vorstellungen. Zwei Enzyme

Untersuchungen über die glykolytischen Enzyme in kernlosen roten Blutzellen

Hexokinase	Christensen, Plimpton u. Ball	(29)
	Rubinstein, Ottolengi und Denstedt	(157)
Phospho-hexoisomerase	Bruns und Vahlhaus	(25)
Phosphohexokinase ..	Wajzen	(187, 188)
	Blanchaer, Brownstone und Williams	(18)
Aldolase	Bruns	(23)
	Bruns und Kirschner	(24)
Glycerinaldehyd-phosphat-Dehydrase	Blanchaer, Williams u. Weiß	(17)
Triosephosphat-Isomerase	Blanchaer, Williams u. Weiß	(17)
Phosphoglycerat-kinase	Blanchaer, Williams u. Weiß	(17)
Diphosphoglycerat-Mutase	Rapoport und Luebering	(149, 151)
	Rapoport und Nieradt	(153)
Diphosphoglyceratase	Rapoport und Luebering	(150)
	Rapoport, Luebering und Wagner	(152)
Enolase	Boszormenyi-Nagy	(19)
Pyruvat-Kinase	Solvonuk und Collier	(177)
Milchsäuredehydrase	Hof und Woller	(74)
	Rubinstein, Ottolengi und Denstedt	(157)

sind dabei von besonderer Bedeutung: Die Glyzerinaldehydphosphat-Dehydrase und die Milchsäure-Dehydrase. Beide Enzyme stehen in enger Beziehung zueinander, denn sie katalysieren die Oxydo-Reduktion zwischen Glyzerinaldehydphosphat und Milchsäure über DPN als Koenzym. Daraus ergibt sich, daß bei vollständigem Abbau der Glukose zu Milchsäure kein direkter Gewinn aus den Dehydrierungsvorgängen entsteht. Allerdings ist daran zu denken, daß die auf der Stufe Glyzerinaldehydphosphat-Diphosphoglyzerinsäure mögliche Umwandlung von anorganischem Phosphat in Esterphosphat nur auf Grund des Energiegefälles dieser Reaktion zustande kommen kann. Das bei der Dehydrierung des Glyzerinaldehydphosphats gebildete DPN·H kann aber nicht nur für die Hydrierung der Brenztraubensäure verwandt werden. In einem solchen Fall ist aber das Endprodukt der Glykolyse nicht Milchsäure, sondern eben die Brenztraubensäure. Diese Tatsache spielt bei der Methämoglobinrückbildung eine Rolle.

Neben den beiden schon erwähnten Dehydrasen ist auch noch die Glukose-6-phosphat-Dehydrase, das sogenannte „Zwischenferment" von Warburg, von Bedeutung. Dieses Ferment eröffnet eine Reaktionskette, die in der letzten Zeit von Horecker und seinen Mitarbeitern weiter aufgeklärt worden ist (81, 82, 167). Aus dem Schema S. 500 gehen die einzelnen Schritte dieses Stoffwechselweges hervor. Als ein wichtiges Intermediärprodukt ist in diesem Zusammenhang das Ribose-5-phosphat zu nennen, das für die Synthese von Nukleotiden benötigt wird. Der Überschuß an Ribose-5-phosphat könnte dann, wie Dische erstmalig zeigen konnte (35, 36) und wie auch die neueren Untersuchungen von Horecker erkennen lassen, über verschiedene Zwischenprodukte wieder in die Glykolyse eingefädelt werden. Es sei an dieser Stelle nur noch darauf hingewiesen, daß die Aktivität dieses Abbauweges bei den Erythrozyten der verschiedenen Tierarten recht unterschiedlich ist, worauf noch im Zusammenhang mit der Methämoglobinrückbildung näher einzugehen ist.

2.4 Die Methämoglobinrückbildung in Erythrozyten

Bereits 1892 konnte Dittrich (37) beobachten, daß eine durch Nitroglyzerin und Azetanilid hervorgerufene Methämoglobinämie bei Hunden am zweiten oder dritten Tag verschwunden ist. Die Suche nach dem Verbleib des Methämoglobins war erfolglos — weder trat es im Urin auf, noch war eine qualitative oder quantitative Veränderung am roten Blutbild festzustellen. Ähnliche Beobachtungen machten in der Folge auch andere Autoren (33, 11, 40). Aber nicht nur innerhalb des Organismus trat diese Methämoglobinrückbildung in Erscheinung, sondern auch in vitro. Sakurai (158) beschäftigte sich eingehend mit diesem Problem. Er konnte zeigen, daß dieser Vorgang innerhalb der Zellen abläuft. Heubner und Rhode hatten die Beobachtung machen können, daß dieser Vorgang nicht an die intakte Erythrozytenstruktur gebunden ist (66). Die weitere Aufklärung der Methämoglobinrückbildung erfolgte dann zunächst von einer ganz anderen Seite her. Den Ausgangspunkt bildeten die Arbeiten von Harrop und Barron über die Steigerung des Sauerstoffverbrauchs der Erythrozyten bei Zusatz von Methylenblau (12, 58, 59). Warburg und seine Mitarbeiter (192) sowie Wendel (200, 201) griffen dieses Problem auf und konnten die Feststellung treffen, daß durch Zugabe von Methylenblau in den Erythrozyten Hb(3) gebildet wird. In weiteren Arbeiten versuchten Wendel und Shaffer die Methylenblauwirkung weiter aufzuklären (202, 203), aber erst Warburg konnte den erhöhten Sauerstoffverbrauch der Erythrozyten richtig deuten. Danach reagiert das Methylenblau direkt mit dem Hämoglobin [Hb(2)] und oxydiert es zu Hb(3). In weiteren Reaktionen oxydiert dann das Hb(3) das endogene Substrat der Erythrozyten oder Substrate des Suspensionsmediums der Zellen unter Vermittlung der Enzymsysteme. Das in der ersten Reaktion entstandene Leukomethylenblau wird durch den Sauerstoff wieder oxydiert.

Damit war aber der Beweis erbracht, daß Hb(3) in den Erythrozyten zu Hb(2) reduziert werden kann. Dieser Vorgang ist mit der Oxydation bestimmter Substrate verbunden. Damit waren zugleich auch die ersten wichtigen Hinweise über die Lokalisation und die Energiequelle der Hb(3)-Rückbildung gewonnen (192—197).

Das Methylenblau-Erythrozyten-System war in der Folge sehr oft der Gegenstand von Untersuchungen (200, 202, 209, 127, 125, 43). Zumeist wurde dieses System aber — wie von seinen Entdeckern — als ein Modell für die Zellatmung benutzt. Dennoch konnte auch wertvolles Material für die Aufklärung der Hb(3)-Reduktion in den roten Blutzellen dabei gewonnen werden. Durch die genauere Untersuchung der Stoffwechselvorgänge in den Erythrozyten (195) gelang es Warburg und Christian, ein Protein, das „Zwischenferment", und ein niedermolekulares Koferment, das TPN, zu isolieren, die mit Glukose-6-phosphat als Substrat zugesetztes Hb(3) zu reduzieren vermochten. Damit war das erste eindeutig definierte Enzymsystem gefunden worden, das in den Erythrozyten die Hb(3)-Reduktion ermöglicht, denn alle Bestandteile dieses Systems waren aus Erythrozyten gewonnen worden.

Wendel (205) und Schapott (159) konnten aber auch die Milchsäure als Substrat der Hb(3)-Rückbildung in

Erythrozyten ermitteln, so daß es sicher war, daß noch ein anderes als das von WARBURG entdeckte Enzymsystem bei der Hb(3)-Rückbildung beteiligt sein mußte.

Ein wesentlicher Beitrag zur Aufklärung der Hb(3)-Rückbildung wurde von KIESE geliefert (99—106). Die folgende Übersicht über den gegenwärtigen Stand der Kenntnisse über dieses Problem ist auf der Grundlage der bisherigen Literatur sowie der eigenen Untersuchungen zusammengestellt worden.

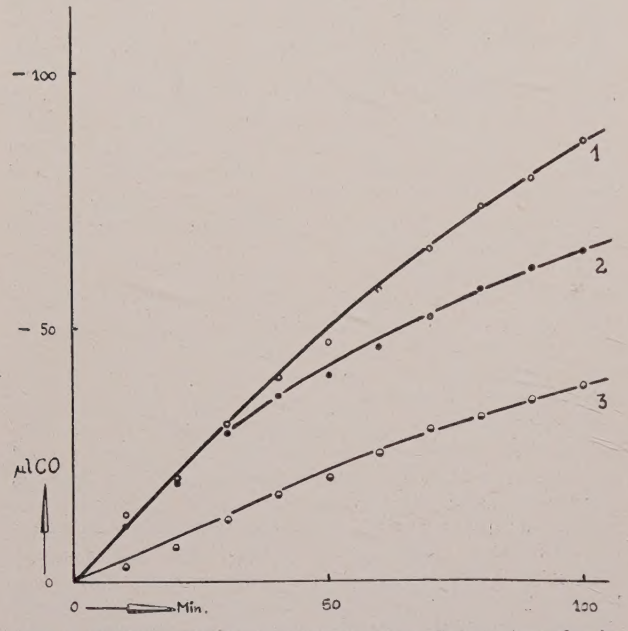


Abb. 1. Methämoglobinrückbildung ohne Substratzugabe in Kaninchenerythrozyten. Hemmbarkeit durch Natriumfluorid und Jodessigsäure

1 Kontrolle ohne Zusatz
2 Natriumfluorid 10^{-2} m
3 Jodessigsäure $5 \cdot 10^{-3}$ m

Werden Hb(3)-haltige Erythrozyten (Präparation s. Methodik) bei 37° inkubiert, so läßt sich eine Abnahme des Hb(3)-Gehalts der Zellen feststellen, auch wenn kein Substrat zugegeben wurde. Die Geschwindigkeit dieser Hb(3)-Rückbildung nimmt ständig ab; nach zwei bis drei Stunden ist sie kaum noch meßbar. Diese Stoffwechselleistung muß auf die nicht auswaschbaren Substrate zurückgeführt werden. Es handelt sich dabei um die nicht diffusiblen Intermediärprodukte der Glykolyse und die bei der Substratverarmung zu erwartenden Abbauprodukte des Zellinhalts. Der Zusatz von 10^{-2} m NaF hemmt diese Rückbildung kaum; durch $5 \cdot 10^{-3}$ m Jodessigsäure kann auch nur ein geringer Teil der „spontanen" Hb(3)-Reduktion unterdrückt werden. Unter der Annahme, daß die angewandten Konzentrationen der Inhibitoren zur weitestgehenden Hemmung der Glyzerinaldehydphosphat-Dehydrase bzw. der Enolase ausreichen, muß geschlossen werden, daß auch noch auf andere Weise als über die normale Glykolyse eine Hb(3)-Rückbildung erfolgen kann. Darauf soll nach Behandlung der Rückbildung durch die einzelnen Substrate noch einmal eingegangen werden.

Durch Zugabe von Glukose zu substratfreien gewaschenen Zellen kommt es zu einer Beschleunigung der spontanen Rückbildung, die von der angewandten Glukosekonzentration abhängig ist. Etwa $3 \cdot 10^{-2}$ m Glukose bewirken eine maximale Beschleunigung, weitere Erhöhung der Konzentration ruft keine Steigerung mehr hervor. Jodessigsäure hemmt die durch Glukose hervorgerufene Rückbildungsbeschleunigung vollständig. Daraus kann geschlossen werden, daß der weitaus größte Teil der Rückbildung durch Glukose über den normalen glykolytischen Abbau dieses Substrats zustande kommt und daß als entscheidende Dehydrierungsaktion die durch das entsprechende Enzym bewirkte Dehydrierung des Glyzerinaldehydphosphats ist. Danach kann man folgendes Schema für die Hb(3)-Rückbildung durch Glukose annehmen (s. S. 494). Die Aktivität der Methämoglobinrückbildung in den Erythrozyten wird durch die geschwindigkeitsbegrenzende Reaktion bestimmt.

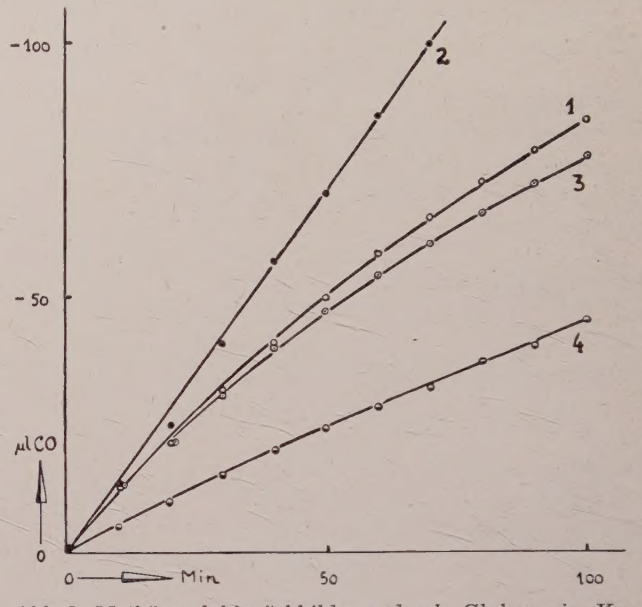
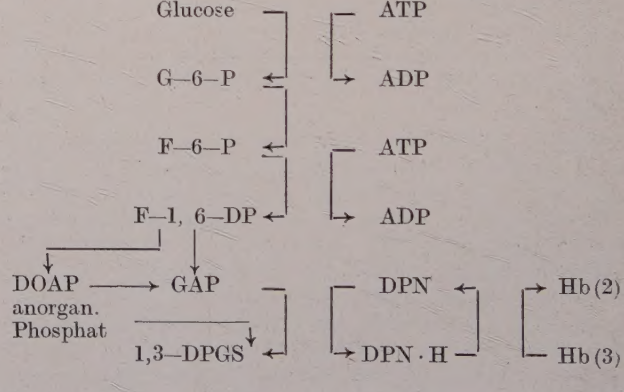


Abb. 2. Methämoglobinrückbildung durch Glukose in Kaninchenerythrozyten. Hemmung durch Natriumfluorid und durch Jodessigsäure

1 Kontrolle ohne Zusatz
2 Glukose 10^{-2} m
3 Glukose 10^{-2} m und NaF 10^{-2} m
4 Glukose 10^{-2} m und Jodessigsäure $5 \cdot 10^{-3}$ m.

In einer Untersuchung über die Stoffwechselaktivität der Erythrozyten im Verlauf der Substratverarmung [MATTHIES (118)] konnte gezeigt werden, daß die Beschleunigung der Rückbildung durch Glukose sehr stark von dem Zeitpunkt der Substratzugabe nach Beginn der Inkubation abhängig ist. Je später nach Versuchsbeginn die Glukose zugegeben wird, desto geringer ist die durch



sie erzielbare Beschleunigung. In dem Maße, wie die Fähigkeit der Zellen zur Rückbildung durch Glukose abnimmt, ist auch eine Abnahme des ATP in den Zellen zu beobachten.

Daraus kann der Schluß gezogen werden, daß die Phosphorylierung der Glukose der geschwindigkeitsbegrenzende Prozeß der Methämoglobinrückbildung durch dieses Substrat ist. Die Bedeutung einer bestimmten kritischen ATP-Konzentration in den Erythrozyten, unterhalb der eine Aufrechterhaltung der sowie durch ungenügende Rephosphorylierung des ADP.

Ein im Prinzip gleiches Verhalten wie Glukose zeigen auch Fruktose und Mannose, allerdings bewirkt Fruktose in niedrigen Konzentrationen eine geringere, in höheren Konzentrationen eine stärkere Rückbildung

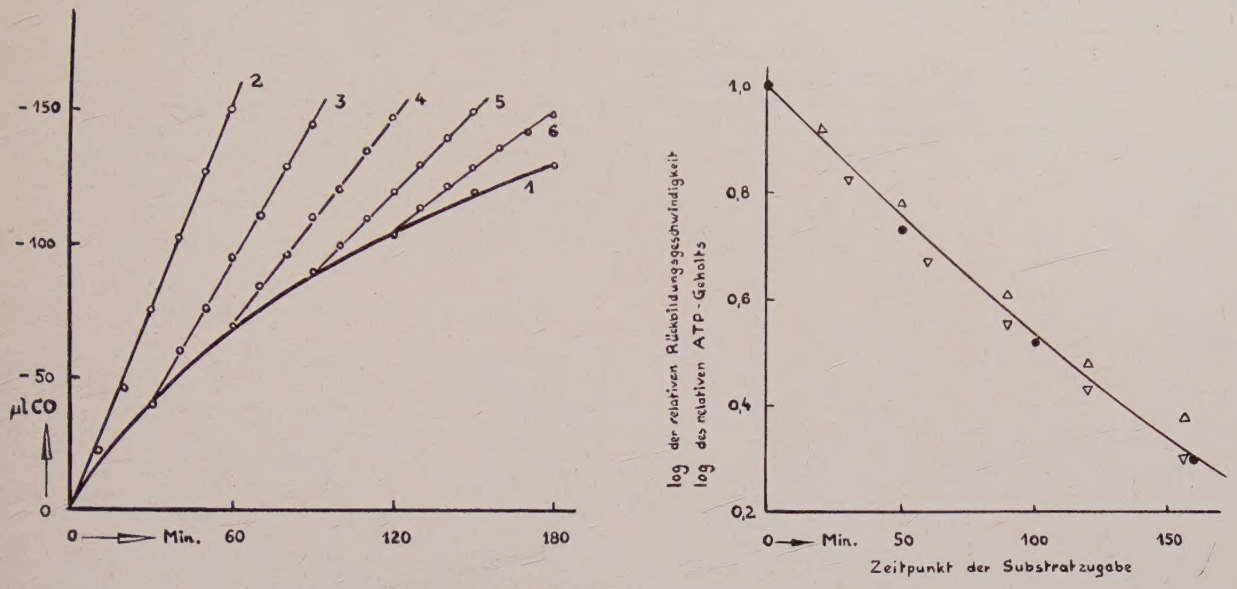


Abb. 3. Methämoglobinrückbildung in Kaninchenerythrozyten.
Rückbildungsbeschleunigung in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Glukosezugabe

1 ohne Substratzugabe
2 Glukose 10^{-2} m zum Versuchsbeginn gegeben
3 Glukose nach 30 Min.
4 Glukose nach 60 Min.
5 Glukose nach 90 Min.
6 Glukose nach 120 Min.

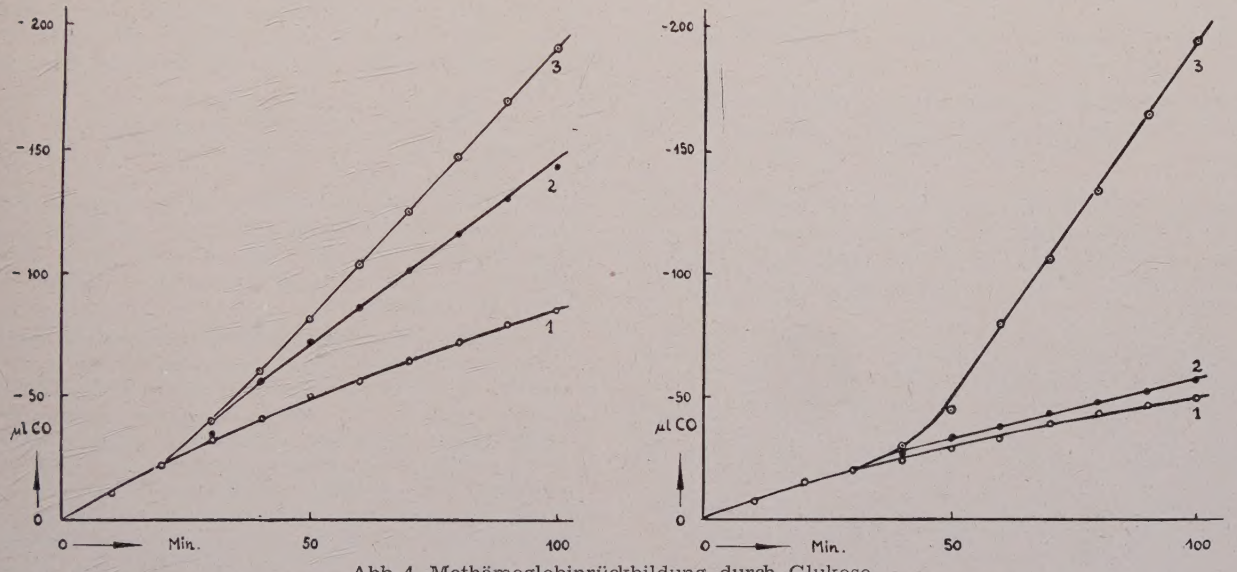


Abb. 4. Methämoglobinrückbildung durch Glukose.
Beschleunigung durch Methylenblau. Links: Kaninchenerythrozyten, rechts: Katzenerythrozyten

1 ohne Substratzusatz
2 Glukose 10^{-2} m
3 Glukose 10^{-2} und Methylenblau 10^{-4} m

normalen und zur Erhaltung der Zelle notwendigen Glykolyse nicht möglich ist, wurde bereits von anderen Autoren erkannt (136, 137, 138).

Natriumfluorid hemmt die Rückbildung durch Glukose nicht so stark und erst im Verlauf von 30 bis 60 Minuten. Das ist verständlich, da der Angriffspunkt des Fluorids an der Enolase zu suchen ist, also an einem Schritt der Glykolyse, der hinter der für die Rückbildung wichtigen Dehydrierung des Glyzerinaldehydphosphats liegt. Die Hemmung kommt erst im Verlauf des Rückstaus von Intermediärprodukten zustande, als Glukose (100, 180). Die Rückbildung durch alle Hexosen ist eine Reaktion 0. Ordnung (180).

Im Verlauf der Aufklärung der Methylenblauwirkung auf den Stoffwechsel der roten Blutzellen gelang es Warburg und seinen Mitarbeitern, eine Glukose-6-phosphat-Dehydrase zu isolieren, die mit TPN als Koenzym Methämoglobin zu reduzieren vermag. Die Reaktion zeichnet sich dadurch aus, daß sie durch Methylenblau oder andere reversible Farbstoffe stark beschleunigt werden kann. Während bei alleiniger Zugabe von Glukose diese Dehydrierungsaktion in den Ery-

throzyten nur eine untergeordnete Rolle spielt, wird bei Zusatz von Methylenblau der größte Teil des Methämoglobins auf diese Weise reduziert. Die Geschwindigkeit dieser Rückbildung liegt um ein Vielfaches höher, als sie durch Glukose hervorgerufen werden kann. Das scheint zunächst im Widerspruch zu stehen zu der vorigen Feststellung, daß die Beschleunigung durch Glukose durch den Phosphorylierungsprozeß begrenzt wird. Denn dann dürfte eine katalytische Erhöhung der Reaktionsgeschwindigkeit auf einer Stufe nach der Phosphorylierung ohne wesentlichen Einfluß auf die Geschwindigkeit der Gesamtreaktion sein. Bei Untersuchung der Aktivität der methylenblau-

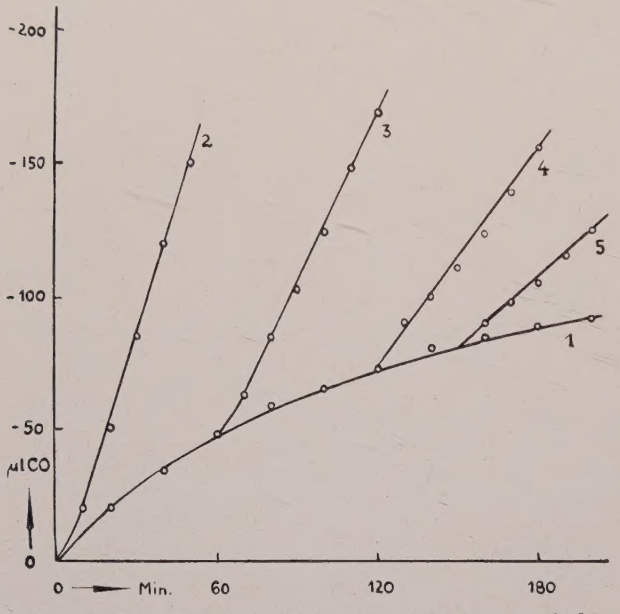
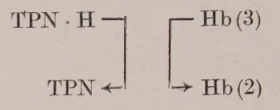


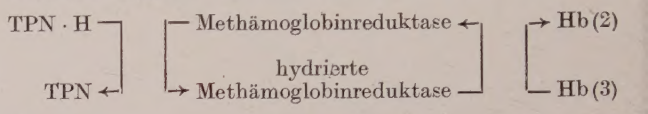
Abb. 5. Methämoglobinrückbildung durch Glukose, methylenblaubeschleunigt, Kaninchenerythrozyten. Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Substratzugabe

beschleunigten Rückbildung durch Glukose in Abhängigkeit von dem Zeitpunkt der Substratzugabe wird aber eine gleiche Abnahme der Rückbildungsbeschleunigung festgestellt, wie bei der Rückbildung durch Glukose allein.

Das heißt aber, daß auch diese Reaktion von dem gleichen Vorgang begrenzt wird wie die Rückbildung durch Glukose ohne Methylenblauzusatz. Der Abbauweg, der durch die Zugabe von Methylenblau eröffnet wird, muß dann aber eine stärkere Ausnutzung des beiden Reaktionswegen gemeinsamen Substrats, des Glukose-6-phosphats, für die Rückbildung ermöglichen, wenn man die höhere Reaktionsgeschwindigkeit der Gesamtrückbildung erklären will. Wie aus dem Schema S. 500 ersichtlich ist, entfallen auf eine Phosphorylierung mindestens doppelt soviel Dehydrierungsreaktionen, wenn der Abbau über die methylenblaubeschleunigten Rückbildungsprozesse erfolgt. Denn außer den beiden TPN-abhängigen Dehydrierungen ist auch noch daran zu denken, daß weitere Hydrierungsmöglichkeiten für die Pyridinnukleotide im Verlauf des weiteren Abbaus des Ribose-5-phosphats stattfinden könnten, sei es durch Wiedereinfädelung in den glykolytischen Abbau (35, 36), sei es durch Reaktionen, wie sie in der letzten Zeit durch die Arbeitsgruppe von Horecker gefunden wurden. Auch eigene Untersuchungen über die Rückbildung durch Ribose würden diese Annahme rechtfertigen (S. 499). Für die beschleunigende Wirkung der reversiblen Farbstoffe auf die Methämoglobinrückbildung durch Glukose, die schließlich die Eröffnung des nichtglykolytischen Abbauweges der Glukose zur Folge hat, gab erstmalig Kiese eine einleuchtende Erklärung. Er konnte die Anwesenheit einer Methämoglobinreduktase in den Erythrozyten nachweisen, welche die Wasserstoffübertragung vom TPN · H auf das Methämoglobin vermittelt, so daß nicht die allgemeine Darstellung:



die wirklichen Verhältnisse wiedergibt, sondern daß man unter Zwischenschaltung der Methämoglobinreduktase folgendes Schema annehmen kann:



Kiese erklärt nun unter Berücksichtigung dieser Befunde die beschleunigende Wirkung der reversiblen Farbstoffe. Unter normalen Verhältnissen ist diese Reaktion zwischen der Reduktase und dem Methämoglobin sehr langsam und spielt deshalb für die Gesamtrückbildung in den Erythrozyten nur eine untergeordnete Rolle. Die reversiblen Farbstoffe werden aber durch die Reduktase sehr schnell reduziert und reagieren auch sehr schnell mit dem Methämoglobin, indem sie es reduzieren. Dadurch erfährt die Rückbildung über das TPN-System insgesamt eine sehr starke Beschleunigung. Damit wird nicht mehr die Reaktion Methämoglobinreduktase-Methämoglobin als langsamste Reaktion geschwindigkeitsbestimmend, sondern eine andere. Wie aus den schon erwähnten Befunden hervorgeht, scheint diese begrenzende Reaktion nunmehr die Phosphorylierung der Glukose zu Glukose-6-phosphat zu sein.

Die Dehydrierungen mit TPN als Koenzym, die hier in Betracht kommen, lassen sich nicht durch Jodessigsäure hemmen. Deshalb wird auch die Rückbildung durch Glukose und Methylenblau durch Jodessigsäure nur zu einem kleineren Teil gehemmt – wahrscheinlich um jenen Anteil, der auch bei Beschleunigung durch Methylenblau über den glykolytischen Abbau der Glukose zustande kommt.

Wenn man die verschiedenen Möglichkeiten der Rückbildung durch Glukose mit derjenigen durch Laktat vergleicht, so ist die letztere viel einfacher und übersichtlicher. Einmal ist keine Phosphorylierung notwendig, um das Substrat zu aktivieren, zum anderen ist der eigentlichen Dehydrierung keine lange Reaktionskette vorgelagert, wenn man von der extraerythrozytären Milchsäure ausgeht. Das wirksame Enzym ist die Milchsäuredehydrase mit DPN als Koenzym. Es läßt sich durch Jodessigsäure nicht hemmen, wohl aber durch hohe Konzentrationen von Pyruvat oder Malonat. Da keine Phosphorylierung notwendig ist, spielt auch der Zeitpunkt der Substratzugabe keine Rolle im Hinblick auf die erzielbare Rückbildungsgeschwindigkeit, wie bei Glukose mit und ohne Methylenblau (118).

Für die Methämoglobinrückbildung durch Laktat läßt sich noch keine endgültige Aussage über ein Zwischenglied zwischen DPN · H und dem Methämoglobin machen. In der Literatur wird häufig behauptet, daß die Reaktion zwischen Laktat oder Glyzerinaldehydphosphat und Methämoglobin unter Vermittlung der entsprechenden DPN-abhängigen Enzyme auch durch Methylenblau beschleunigt werden kann (50, 57). Diese Annahme beruht wahrscheinlich auf der falschen Deutung der Tatsache, daß Methylenblau sowohl die

Oxydation von Glukose als auch die von Laktat in Sauerstoffgegenwart beschleunigen kann. Das ist aber nicht durch eine Beschleunigung der eigentlichen Enzymreaktion zu erklären, sondern durch Erhöhung der Methämoglobinkonzentration infolge der Oxydation durch den Farbstoff. Da bei niederen Methämoglobinkonzentrationen die Rückbildung sehr stark abhängig von der Konzentration der oxydierten Form des Blutfarbstoffs ist, wird die Erhöhung der Reaktionsgeschwindigkeit verständlich, ohne daß eine Beschleunigung der Reaktion zwischen DPN·H und Methämoglobin angenommen werden muß, wie das bei den Glykolyse gespeiste Methämoglobinrückbildung sicherlich das gleiche wie für die Rückbildung durch Laktat.

Gutmann, Jandorf und Bodansky (57) haben versucht, dieses Problem zu lösen. Sie kommen allerdings zu dem Ergebnis, daß die Reaktion zwischen DPN·H und Methämoglobin durch Methylenblau beschleunigt wird und auch schon ohne diesen Farbstoff abläuft. Ihre Untersuchungen wurden aber mit ungereinigten DPN-Präparationen durchgeführt, die fast immer TPN enthalten, auch haben sie lediglich gereinigtes, aber nicht mehrfach umkristallisiertes Methämoglobin verwandt, so daß die Anwesenheit von Methämoglobinreduktase ebenfalls

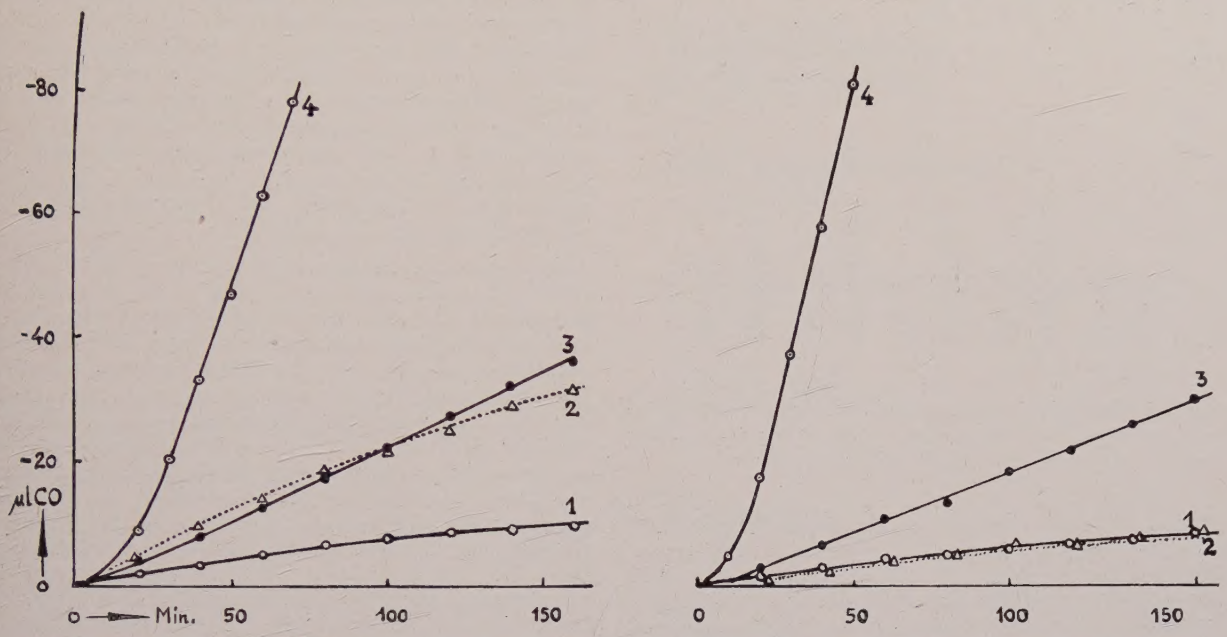


Abb. 6. Methämoglobinrückbildung in normalen (links) und in pathologischen menschlichen Erythrozyten (rechts).
1 ohne Zusatz 2 Laktat 10^{-2} m 3 Glukose 10^{-2} m 4 Glukose 10^{-2} und Methylenblau 10^{-4} m

TPN-abhängigen Systemen der Fall ist. Die starke Beschleunigung der Milchsäureoxydation tritt deshalb nur aerob im Vergleich zu den gleichen Ansätzen ohne Methylenblauzusatz auf. Unter anaeroben Verhältnissen ist aber die Methämoglobinreduktion durch Laktat bei Zusatz von Methylenblau nur geringfügig beschleunigt. Das ist wahrscheinlich auf die Beschleunigung der Rückbildung durch endogenes Substrat zurückzuführen, die ja zum Teil zumindest über die TPN-abhängigen Systeme erfolgt. In der Tat konnten eigene Untersuchungen diese Vermutung bestätigen. Die Beschleunigung der Rückbildung durch Laktat bei Methylenblauzusatz hat etwa dieselbe Größe wie die Beschleunigung der substratfreien Rückbildung durch den Farbstoff (Tabelle 1). Damit ist nun noch nichts gegen eine DPN-abhängige Methämoglobinreduktase gesagt, sondern nur ihre Beeinflussung durch reversible Farbstoffe widerlegt. Vielmehr konnten eigene Untersuchungen der Erythrozyten eines Falles von idiopathischer Methämoglobinämie die Befunde von Gibson (50) bestätigen, daß es in dieser Krankheitsgruppe Formen gibt, bei denen ein solcher Kofaktor zwischen dem DPN·H und dem Methämoglobin fehlt. Es sei an dieser Stelle bemerkt, daß außer dieser Form der idiopathischen Methämoglobinämie mit pathologischem Fermentsystem auch eine solche beobachtet wurde, bei der ein anormaler Blutfarbstoff vorliegt (83). Das Krankheitsbild ist also in pathogenetischer Hinsicht nicht einheitlich.

In bezug auf die Methämoglobinreduktase gilt für die nicht über die TPN-Systeme, sondern über die normale nicht ausgeschlossen werden kann. Die Versuche von Altmann (7) wurden mit Fraktionen einer Zytochrom-Reduktase-Präparation lediglich am Glukose-6-phosphat-System durchgeführt. Einen weiteren Hinweis auf die Unterschiedlichkeit der beiden denkbaren Methämoglobinreduktasen konnten auch eigene Untersuchungen über die Methämoglobinrückbildung in Retikulozyten liefern. Danach machen die TPN-abhängigen Rückbildungssysteme während der Erythrozytenreifung eine Veränderung im Sinne einer Aktivitätsabnahme durch, während die DPN-abhängigen

Tabelle 1. Beschleunigung der Methämoglobinrückbildung durch Laktat bei Methylenblauzusatz

Die Zahlen geben die CO-Absorption gleicher Zellsuspensionsmengen in 60 Min. an und sind Mittelwerte von je 5 Ansätzen.

Versuch	ohne Substrat	Glukose 10^{-2} m	Laktat 10^{-2} m
306a mit Methylenblau	38,4	90,2	99,5
ohne Methylenblau	30,7	67,2	95,0
Beschleunigung	7,7	22,6	4,5
306c mit Methylenblau	49,5	—	143,8
ohne Methylenblau	41,1	—	137,1
Beschleunigung	8,4	—	6,7

Rückbildungsvorgänge in Retikulozyten und in reifen Zellen gleich aktiv sind, was von uns auf einen unterschiedlichen Abbau der beiden Methämoglobinreduktasen während der Reifung zurückgeführt wird (122). Nun haben kürzlich Huennekens, Basford und Gabrio (84) über eine DPN·H-Oxydase aus Schweineherzen berichtet, die sehr ähnlich einer von ihnen ebenfalls isolierten TPN-spezifischen Methämoglobinreduktase aus menschlichen Erythrozyten sein soll. Entgegen allen bisherigen Vorstellungen sollen diese Reduktasen kein Flavin enthalten. Nach allem, was bisher also über dieses Problem bekannt ist, bleibt noch einiges zur Aufklärung dieser Fragen zu tun.

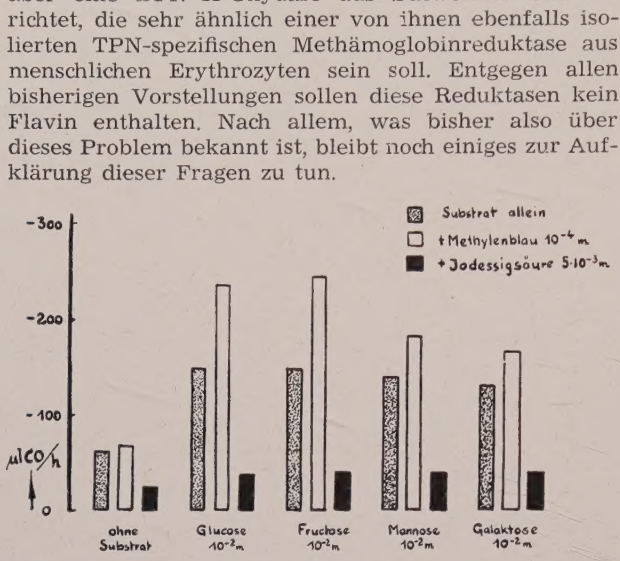


Abb. 7. Methämoglobinrückbildung durch Hexosen in Kaninchenerythrozyten. Hemmung durch Jodessigsäure, Beschleunigung durch Methylenblau.

Neben Glukose und Laktat, die als die eigentlichen Substrate der Methämoglobinrückbildung unter physiologischen Bedingungen anzusehen sind (100), wurde noch eine Reihe anderer biologisch wichtiger Substanzen auf ihre Fähigkeit zur Reduktion des Methämoglobins in Erythrozyten oder Hämolysaten untersucht. Neben Glutathion und Askorbinsäure, die bereits im Zusammenhang mit der Autoxydation des Hämoglobins Erwähnung fanden, ist auch Glyzerinaldehyd in der Lage, Methämoglobin in direkter Reaktion zu reduzieren (100).

Neben diesen direkt reagierenden Substanzen wurden weitere gefunden, die erst durch Vermittlung bestimmter Enzymsysteme wirksam werden können. Ähnlich wie für Glukose und Fruktose ist auch für andere Hexosen die Fähigkeit zur Methämoglobinrückbildung bekannt. Mannose und Galaktose zeigen eine geringere Wirkung als Glukose, sind aber auch durch Methylenblau in ihrer Wirkung zu steigern und durch Jodessigsäure zu hemmen.

Die nach Hemmung durch Jodessigsäure verbleibende Restrückbildung ist bei den vier untersuchten Hexosen gleich groß. Das deutet darauf hin, daß die Rückbildung in Gegenwart dieses Hemmstoffes bei allen genannten Substanzen über das gleiche Fermentsystem, nämlich über die TPN-abhängigen Reaktionen des Horeckerzyklus, abläuft, und zwar bei Substratsättigung der geschwindigkeitsbegrenzenden Reaktion — wie vorher ausgeführt, die Reduktion des Methämoglobins durch die Methämoglobinreduktase.

Im Gegensatz zu den eigenen Ergebnissen konnten Spicer, Hannah und Clark (180) keine Wirkung der Galaktose auf die Methämoglobinrückbildung feststellen. Allerdings benutzten sie für ihre Versuche Hundeerythrozyten, die zur Untersuchung der Methämoglobinrückbildung nicht so geeignet sind, da sie nur einen sehr geringen Stoffwechsel haben. Die Verwertung der Galaktose für die Rückbildung setzt die Anwesenheit von besonderen Fermentsystemen voraus, die eine Umwandlung der Galaktose in Glukosephosphat ermöglichen. In menschlichen Erythrozyten wurden diese Enzyme bereits nachgewiesen (26, 27, 85, 165) und ihre Bedeutung im Zusammenhang mit der Galaktosämie der Säuglinge untersucht. Es handelt sich um die Galaktokinase, welche die Phosphorylierung der Galaktose ermöglicht und die Galaktowaldenase mit Uridindiphosphatglukose als Koenzym, welches die Umwandlung des Galaktosephosphats zu Glukosephosphat katalysiert.

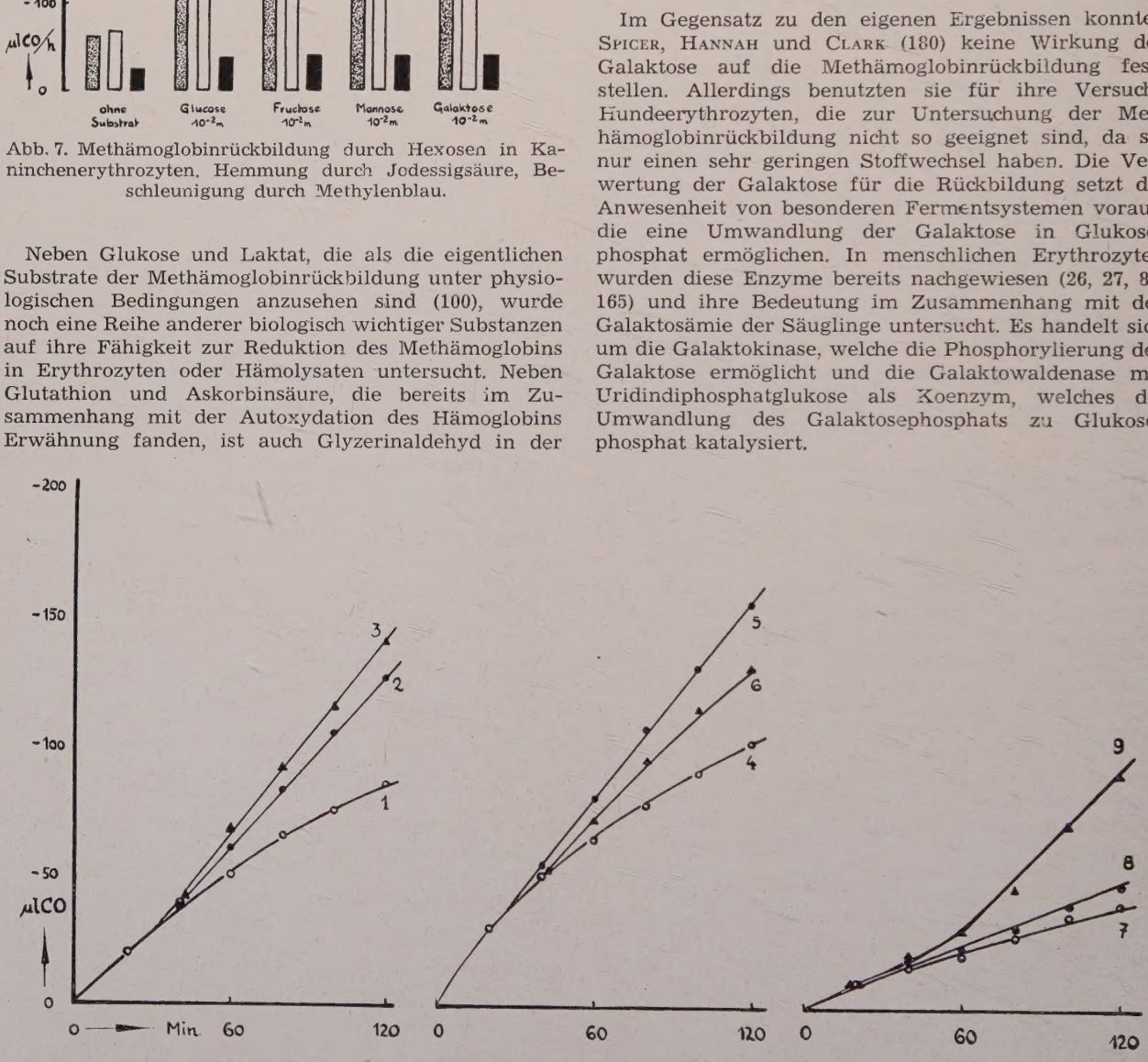


Abb. 8. Methämoglobinrückbildung durch Ribose und Glukose, Hemmung durch Jodessigsäure, Beschleunigung durch Methylenblau.

1 Kontrolle ohne Zusatz
2 Glukose 10^{-2} m
3 Ribose 10^{-2} m
4 Methylenblau 10^{-4} m
5 Glukose und Methylenblau
6 Ribose und Methylenblau
7 Jodessigsäure $5 \cdot 10^{-3}$ m
8 Glukose und Jodessigsäure
9 Ribose und Jodessigsäure.

Folgende Kohlenhydrate sollen keine Wirkung auf die Methämoglobinrückbildung besitzen: d-Ribose, d-Xylose, d- und l-Arabinose, Galaheptose, l-Sorbose, d-Altrose, Trehalose, Melecitose, Lactose, Sukrose (180). Da auch diese Untersuchungen an Hundeerythrozyten durchgeführt wurden, möchten wir ihnen nicht allzuviel Gewicht beimessen. Für die Ribose konnten an Kaninchenerythrozyten die Angaben jedenfalls in eigenen Versuchen nicht bestätigt werden. Danach hat Ribose in einer Konzentration von 10^{-2} m sogar eine stärkere Beschleunigung der endogenen Rückbildung zur Folge als Glukose in der gleichen Konzentration. Es ergeben sich beträchtliche Unterschiede zum Verhalten der Glukose bei Anwendung von Methylenblau und von Jodessigsäure. Während durch 10^{-4} m Methylenblau die schon mehrfach erwähnte Steigerung der Rückbildung durch Glukose erzielt werden kann, ist bei Ribose als Substrat eher eine geringgradige Hemmung der Rückbildung zu beobachten.

Andererseits ist die Hemmung der Rückbildung mit Ribose durch Jodessigsäure nur vorübergehender Natur; nach etwa 1 bis 1½ Stunden ist die Rückbildungsgeschwindigkeit fast ebenso groß wie in den Ansätzen mit Ribose ohne Zusatz des Hemmstoffs. Es scheint so zu sein, daß in weit größerem Umfange als bei den anderen Kohlenhydraten nichtglykolytische Fermentsysteme für die Rückbildung nutzbar gemacht werden.

Entsprechend der Reaktion durch Laktat wurden auch die Rückbildungen durch Fumarat und Malat als Reaktionen 1. Ordnung bestimmt (180). Nicht wirksam waren in diesen Untersuchungen an Hundeerythrozyten Sukzinat, Pyruvat, Citrat, Azetat, β-Hydroxybutyrat, Malonat, Glutamat, Methylglyoxal und Azetaldehyd. Auf das letztere Substrat wird noch im Zusammenhang mit den eigenen Untersuchungen über die Wirkung der Aldehyde auf den Stoffwechsel der Erythrozyten näher eingegangen.

Tierart	ohne Substrat	Glukose 10^{-2} m	MB 10^{-4} m Glukose 10^{-2} m	Laktat 10^{-2} m	Formaldehyd $5 \cdot 10^{-5}$ m
Kaninchen	65,9	195,8	301,0	286,5	286,9
Meerschweinchen	27,3	70,1	358,6	157,5	160,1
Ratte	28,6	69,4	550,0	123,0	96,1
Mensch	32,5	49,0	279,0	48,0	42,0
Katze	15,2	30,8	178,0	51,9	77,0
Hund	32,1	44,0	135,3	62,8	62,0
Schaf	12,3	55,3	138,2	62,2	61,5
Schwein	16,9	18,5	25,5	36,8	77,5
Pferd	18,5	24,6	33,9	85,2	12,6
Rind	14,0	38,4	112,3	38,5	10,2
Ziege	7,6	36,7	43,1	46,4	40,0

Die Werte geben die Rückbildungsgeschwindigkeit nach Zugabe der Substrate in $\frac{\mu l\ CO}{h \times ml\ Zellen}$ an.

Kaninchen	33,6	100,0	154,0	146,2	146,0
Meerschweinchen	39,0	100,0	511,0	224,5	228,0
Ratte	41,2	100,0	794,0	177,0	139,0
Mensch	66,4	100,0	570,0	98,0	85,6
Katze	49,0	100,0	578,0	169,0	250,0
Hund	73,0	100,0	378,0	143,0	143,0
Schaf	22,2	100,0	250,0	112,8	111,5
Schwein	91,3	100,0	138,0	199,0	419,0
Pferd	5,1	100,0	138,0	346,0	51,0
Rind	38,4	100,0	292 0	100,2	26,3
Ziege	20,7	100,0	117,5	126,5	109,0

Die Werte sind bezogen auf die Rückbildungsgeschwindigkeit nach Glukosezusatz.

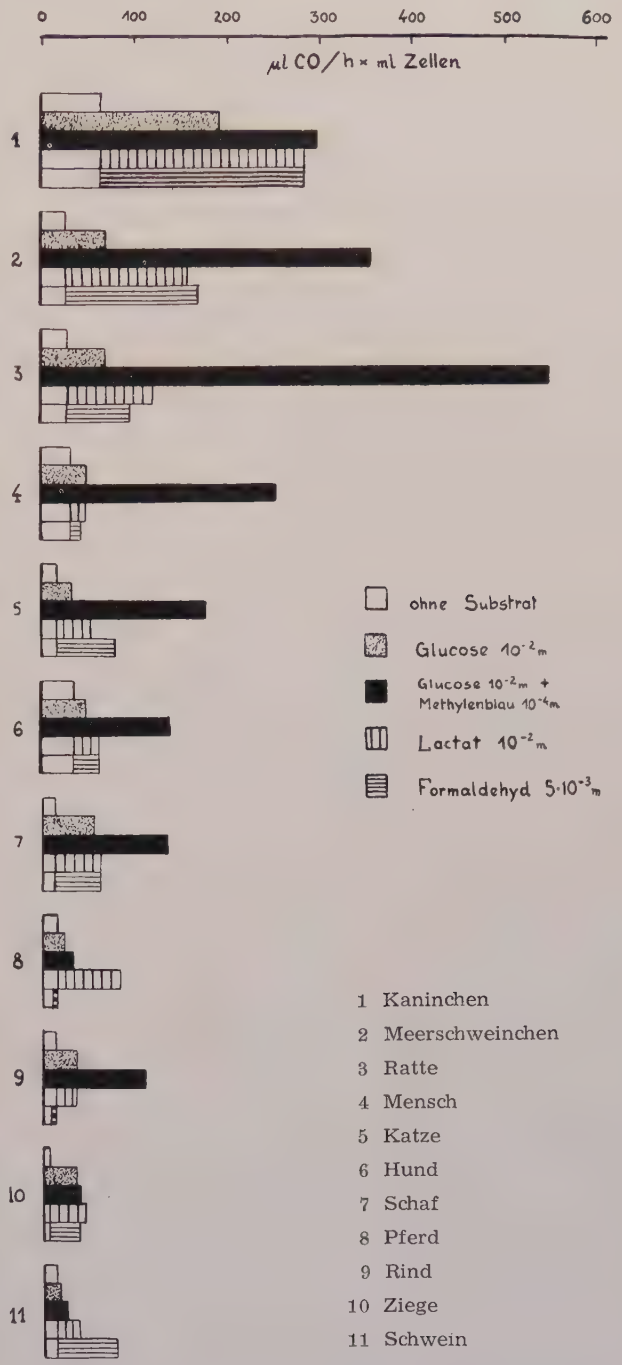


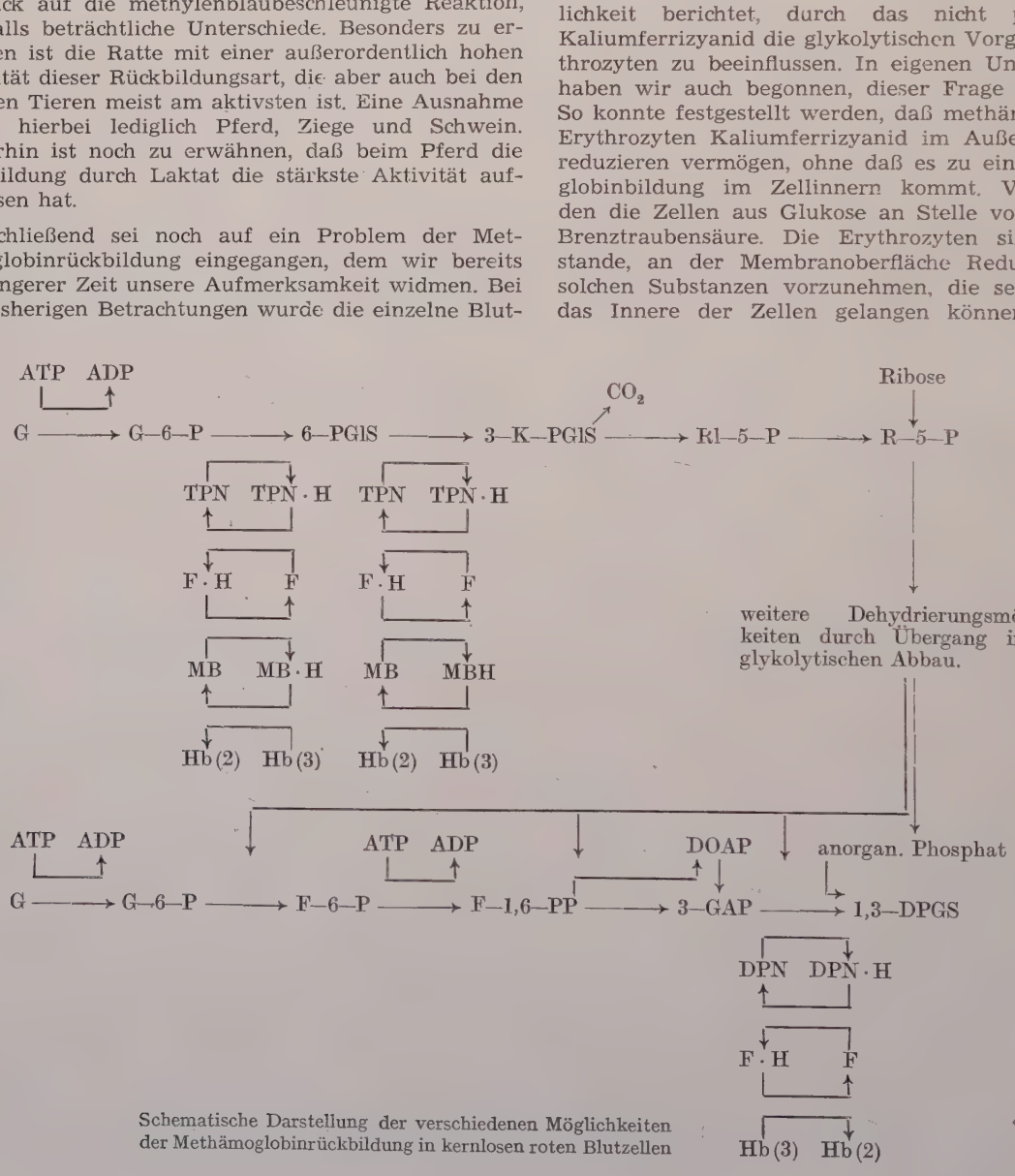
Abb. 9. Aktivität der verschiedenen Rückbildungssysteme in den Erythrozyten von 11 verschiedenen Tierarten

Wie schon mehrfach erwähnt wurde, bestehen bezüglich der Aktivität der Gesamtrückbildung in den Erythrozyten verschiedener Tierarten beträchtliche Unterschiede. Ebenso hat sich gezeigt, daß auch im Hinblick auf die einzelnen Rückbildungssysteme, wie sie hier

Erwähnung fanden, von Tierart zu Tierart andere Verhältnisse gefunden werden. Aus dieser Tatsache erklären sich viele Unstimmigkeiten bei Vergleich der Angaben der einzelnen Autoren, je nachdem, welche Erythrozyten sie als Untersuchungsmaterial verwandten. Es erwies sich deshalb im Verlauf unserer Untersuchungen als notwendig, eine vergleichende Untersuchung über die Methämoglobinrückbildung in den Erythrozyten verschiedener Tierarten durchzuführen, und zwar mit den von uns angewandten Methoden. In den folgenden Diagrammen und Tabellen sind die Ergebnisse einer orientierenden Untersuchungsreihe an 11 verschiedenen Haus- und Laboratoriumstieren zusammengestellt worden. Daraus geht hervor, daß sich eine Gruppe von Tieren durch Erythrozyten mit einer sehr starken Stoffwechselaktivität in bezug auf die Methämoglobinrückbildung auszeichnet, und zwar sind das Kaninchen, Meerschweinchen und Ratte. Ihnen gegenüber steht eine Gruppe mit einer sehr geringen Rückbildungsaktivität: Pferd, Rind, Ziege und Schwein — und zwischen beiden Gruppen nehmen die übrigen untersuchten Spezies eine Mittelstellung ein, das sind Mensch, Hund, Katze und Schaf. Wenn man die einzelnen Rückbildungsarten bei ein und derselben Tierart vergleicht, so ergeben sich, insbesondere im Hinblick auf die methylenblaubeschleunigte Reaktion, ebenfalls beträchtliche Unterschiede. Besonders zu erwähnen ist die Ratte mit einer außerordentlich hohen Aktivität dieser Rückbildungsart, die aber auch bei den anderen Tieren meist am aktivsten ist. Eine Ausnahme bilden hierbei lediglich Pferd, Ziege und Schwein. Weiterhin ist noch zu erwähnen, daß beim Pferd die Rückbildung durch Laktat die stärkste Aktivität aufzuweisen hat.

Abschließend sei noch auf ein Problem der Methämoglobinrückbildung eingegangen, dem wir bereits seit längerer Zeit unsere Aufmerksamkeit widmen. Bei den bisherigen Betrachtungen wurde die einzelne Blutzelle als eine abgeschlossene Einheit aufgefaßt, die jede für sich den Rückbildungsprozeß in gleicher Weise, natürlich mit der biologisch begründeten Variationsbreite, erkennen läßt. Es tauchte aber die Frage auf, inwieweit bei unterschiedlichem Methämoglobingehalt der einzelnen Individuen der Erythrozytenpopulation eine wechselseitige Beeinflussung zwischen den methämoglobinarmen und den methämoglobinreichen Zellen eine Rolle spielt. Unsere Untersuchungen haben nun ergeben, daß die Methämoglobinrückbildung nicht als Leistung der einzelnen Zelle verstanden werden kann, sondern daß sie eine Leistung der gesamten Zellpopulation darstellt. Die methämoglobinfreien Erythrozyten beteiligen sich gewissermaßen an den Rückbildungsvorgängen in den methämoglobinreichen Zellen. Es gelang auch, einen möglichen Mechanismus dieser Wechselbeziehung aufzuklären (93, 121).

Von dieser Fragestellung ist es kein weiter Schritt zu dem Problem der Einwirkung von Stoffen auf die Vorgänge im Zellinnern, die nicht permeieren können. Diese Frage ist von großer pharmakologischer Bedeutung, denn sicherlich wirkt eine große Zahl von Substanzen und pharmakologischen Agentien auf die intimen Stoffwechselprozesse der Zellen, ohne selbst einzudringen. Manyai und Szekely (116) haben bereits über die Möglichkeit berichtet, durch das nicht permeierende Kaliumferrizyanid die glykolytischen Vorgänge im Erythrozyten zu beeinflussen. In eigenen Untersuchungen haben wir auch begonnen, dieser Frage nachzugehen. So konnte festgestellt werden, daß methämoglobinfreie Erythrozyten Kaliumferrizyanid im Außenmedium zu reduzieren vermögen, ohne daß es zu einer Methämoglobinbildung im Zellinnern kommt. Vielmehr bilden die Zellen aus Glukose an Stelle von Milchsäure Brenztraubensäure. Die Erythrozyten sind also imstande, an der Membranoberfläche Reduktionen von solchen Substanzen vorzunehmen, die selbst nicht in das Innere der Zellen gelangen können. Wird der



Schematische Darstellung der verschiedenen Möglichkeiten der Methämoglobinrückbildung in kernlosen roten Blutzellen

gleiche Versuch mit methämoglobinhaltigen Erythrozyten durchgeführt, so ist die Reduktion des Kaliumferrizyanids im Außenmedium vergleichsweise nur sehr gering. Die Methämoglobinrückbildung in den Erythrozyten läuft aber in der gleichen Zeit normal ab. Es wird also der spezifischen intrazellulären Stoffwechselleistung in diesem Fall der Vorzug gegeben. Die ganze Problematik bedarf noch einer gründlichen Bearbeitung. So wird aber doch ersichtlich, daß sie für eine Reihe von theoretischen Erwägungen und praktischen Fragen von Bedeutung ist. Es wird auch gerade auf Grund der letzten beiden Problemstellungen klar, daß neben den behandelten Vorgängen der Methämoglobinrückbildung in den Erythrozyten noch eine ganze Zahl von komplizierenden Faktoren hinzutritt, wenn man diese Vorgänge im Zusammenhang mit dem Gesamtorganismus betrachten will.

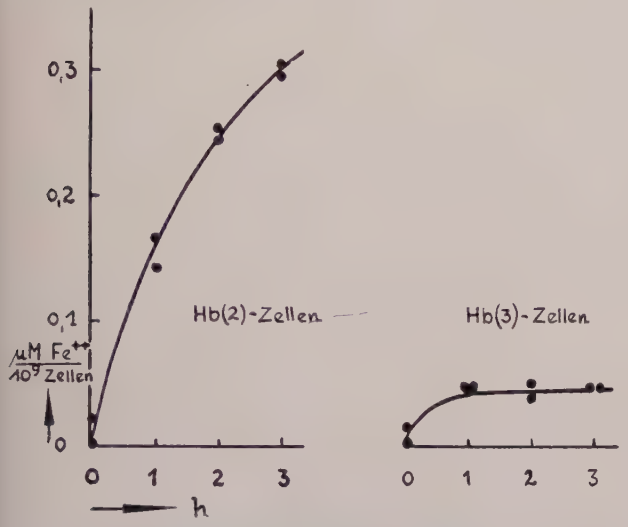


Abb. 10. Reduktion von Kaliumferrizyanid im Außenmedium einer Kaninchenerythrozyten-Suspension

3. Die Wirkung von Formaldehyd auf Erythrozyten

Im Zusammenhang mit den Untersuchungen über den Mechanismus der Hämolyse lag es nahe, den Ablauf dieses Vorgangs unter der Einwirkung eiweißfixierender, also membranstabilisierender Agentien zu überprüfen, um daraus Rückschlüsse auf die Bedeutung der Membraneigenschaften für die Hämolyse ziehen zu können. Neben anderen Adstringentien, wie Schwermetallsalzen und Tannin, wurde auch Formaldehyd verwandt. Die Fähigkeit des Formaldehyds, Vernetzung von Eiweißmolekülen herbeizuführen, wird ja allgemein als die Ursache der adstringierenden Wirkung angesehen. Dabei liegt der Angriffspunkt vor allem an den NH- und NH_2-Gruppen der Proteine.

Wilbrandt und Wyss (207) haben diese Frage eingehender untersucht. Sie konnten feststellen, daß die Zugabe von Formaldehyd bis zu einer Konzentration von 8% (2,66 m) unmittelbar vor dem Hämolyseversuch die Wasserhämolyse beträchtlich verzögert. Weiterhin scheint der Formaldehyd nach längerer Einwirkung (3 bis 4 h) die Membran so zu verändern, daß sich die Hämolyse durch Glykol und die durch Harnstoff nicht mehr — wie normalerweise — durch ihre Geschwindigkeit unterscheiden. Trotz dieser Hämolyseverzögerung muß man aber mit einer Schädigung der Erythrozyten auf Grund der Formaldehydwirkung rechnen, denn die Resistenz der Zellen nimmt bei fortdauernder Einwirkung des Aldehyds ab, allerdings erst bei Konzentrationen über 0,5% ($1{,}66 \cdot 10^{-1}$ m).

Ponder (141) sieht als Ursache der Formaldehydwirkung auf die Hämolyse die durch den Aldehyd bewirkte Gelierung des Zellinhalts an, die zu einer Verlangsamung der Diffusionsvorgänge führen soll. Bei Jung (94) finden sich Angaben über die licht- und elektronenoptisch wahrnehmbaren Veränderungen durch Formaldehyd an den Erythrozyten. Konzentrationen von 1,5 g/l ($5 \cdot 10^{-2}$ m) beeinträchtigten deutlich die Zellstruktur, 1 g/l ($3{,}3 \cdot 10^{-2}$ m) stabilisieren das Plasmolemm und hemmen die Ablösung des Epilemms bei thermischer Schädigung. Es wird aber zugleich betont, daß der Zeitfaktor bei allen diesen Effekten eine große Rolle spielt. In der gleichen Arbeit wurde auch die Bindung des Formaldehyds an die Zellen untersucht. Danach wird zunächst ein Teil des Aldehyds in einer schnellen Reaktion an die Erythrozyten gebunden, ein kleinerer Teil bindet sich weitaus langsamer; diese Reaktion dauert aber noch an, wenn die schnelle Bindung abgeschlossen ist. Die Bindung des Aldehyds an die Erythrozyten ist teilweise reversibel. Für diese schnelle Bindung, die nach Jung eine Funktion des Zellvolumens und nicht der Oberfläche sein soll, gibt Scheler eine Deutung (164a). Er konnte zeigen, daß alkalisches Methämoglobin eine Formaldehydverbindung bildet, und gibt die Dissoziationskonstante dieser Verbindung mit $K = 1{,}8 \cdot 10^{-2}$ m Formaldehyd an. Allerdings unterscheidet sich diese Methämoglobinverbindung in ihrem Verhalten von den anderen bekannten Verbindungen des Methämoglobins. Ebenso wie Veränderungen des Methämoglobins sind auch solche des Hämoglobins bekanntgeworden. Guthe (56) hat die Veränderung des Sauerstoff-Bindungsvermögens des Hämoglobins durch Formaldehyd untersucht und fand neben einer unwesentlichen Denaturierung des Farbstoffs bei Konzentrationen von 10^{-1} m Formaldehyd im neutralen Bereich eine Vergrößerung der Affinität des Hämoglobins zum Sauerstoff. Außerdem fiel eine sehr langsame Einstellung der Gleichgewichte in Formaldehydgegenwart auf. Eine endgültige Deutung dieser Befunde konnte der Autor nicht geben: er vermutete die Ursache der Veränderung der Eigenschaften des Hämoglobins in der Bindung des Formaldehyds an das Globin.

Diese morphologischen und physico-chemischen Untersuchungen lassen noch vollständig die Frage nach den Wirkungen des Formaldehyds auf den Stoffwechsel der roten Blutzellen offen. Wenn man den Ausgangspunkt der Betrachtungen, die Hämolysebeeinflussung, noch einmal aufgreifen will, so wäre natürlich auch an die Beeinflussung des aktiven Kationentransports zu denken, der ja in enger Beziehung zu den Hämolyseproblemen steht. Weiterhin wäre die Frage nach der Wirkung des Formaldehyds auf die spezifische Stoffwechselleistung der Erythrozyten, auf die von uns eingehender untersuchte Methämoglobinrückbildung zu beantworten.

Die schon erwähnte Tatsache der Veränderung der Eigenschaften des Hämoglobins durch Formaldehyd macht es wahrscheinlich, daß auch andere Enzyme eine Veränderung ihrer funktionellen Eigenschaften erfahren. Darüber liegt bereits einiges Material vor. So sind wiederholt Untersuchungen über die Veränderung der Aktivität von Phosphatasen durch Formaldehyd durchgeführt worden (1—4, 9, 51, 53, 132, 168) Diese Enzyme sind deshalb leicht durch Formaldehyd hemmbar, weil sie anscheinend zu ihrer Funktion freie NH- oder NH_2-Gruppen benötigen. Das gilt auch für die Erythrozytenpyrophosphatase (132). Auch die saure Phosphatase in den Erythrozyten wird von 0,5% ($1{,}5 \cdot 10^{-1}$ m) Formaldehyd völlig inaktiviert, im Gegensatz zu dem gleichen Enzym aus der Prostata (1—4). Hemmende Wirkungen des Formaldehyds wurden auch bei verschiedenen Cholinesterasepräparationen ge-

funden (183). Eine 50%ige Hemmung der Oxydation von Sukzinat, Sarkosin und l-Prolin in Rattenleberhomogenaten durch Formaldehyd in Konzentrationen von 10^{-3} bis 10^{-2} m konnte von BERNHEIM beobachtet werden (14). Zytochromoxydase, Aminoxydase und die d-Aminosäureoxydase blieben unbeeinflußt. Bei den hemmbaren Enzymen war ein deutlicher Schutz gegen die Formaldehydwirkung durch vorherige Substratzusätze erzielbar. Das weist darauf hin, daß der Angriff des Aldehyds zumindest an einer aktiven Gruppe der genannten Enzyme erfolgt. WATTS (199) kommt in bezug auf die Sukzinat-Oxydation zu dem gleichen Ergebnis. Er stellte darüber hinaus die Hemmung einer Reihe fermentativer Prozesse komplexerer Natur durch Formaldehyd fest.

In der Regel wurden die erwähnten Untersuchungen zur Analyse der aktiven Gruppen der genannten Fermente durchgeführt. Lediglich WATTS diskutiert seine Ergebnisse im Hinblick auf das toxikologische Problem der Methanolvergiftung. Alle diese Arbeiten gaben uns aber nur ungenügende oder überhaupt keine Hinweise auf die mögliche Beeinflussung der Methämoglobinrückbildung in den Erythrozyten, so daß sich eigene Untersuchungen notwendig machten.

4. Die Wirkung von Aldehyden auf die Methämoglobinrückbildung in kernlosen Erythrozyten

Die ersten Untersuchungen über die Wirkung von Aldehyden auf die Methämoglobinrückbildung wurden mit Formaldehyd durchgeführt. In Anlehnung an die Versuche von JUNG (94) und die Arbeit von WILBRANDT (207) erfolgte zunächst lediglich eine Vorbehandlung der Zellen mit Formaldehyd, der anschließend durch dreimaliges Waschen so weit wie möglich entfernt wurde. Die so vorbehandelten Erythrozyten dienten dann zur Herstellung einer Zell-

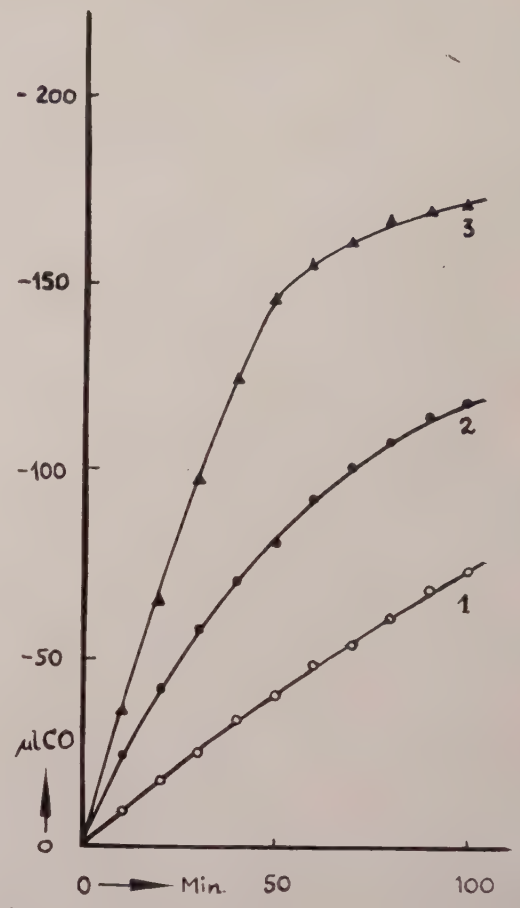


Abb. 11. Methämoglobinrückbildung in Kaninchenerythrozyten nach Vorbehandlung mit Formaldehyd

1 unbehandelte Kontrollen
2 mit $3 \cdot 10^{-3}$ m Formaldehyd vorbehandelt
3 mit 10^{-2} m Formaldehyd vorbehandelt
Vorbehandlungsdauer 20 Min., anschließend dreimaliges Waschen der Zellen

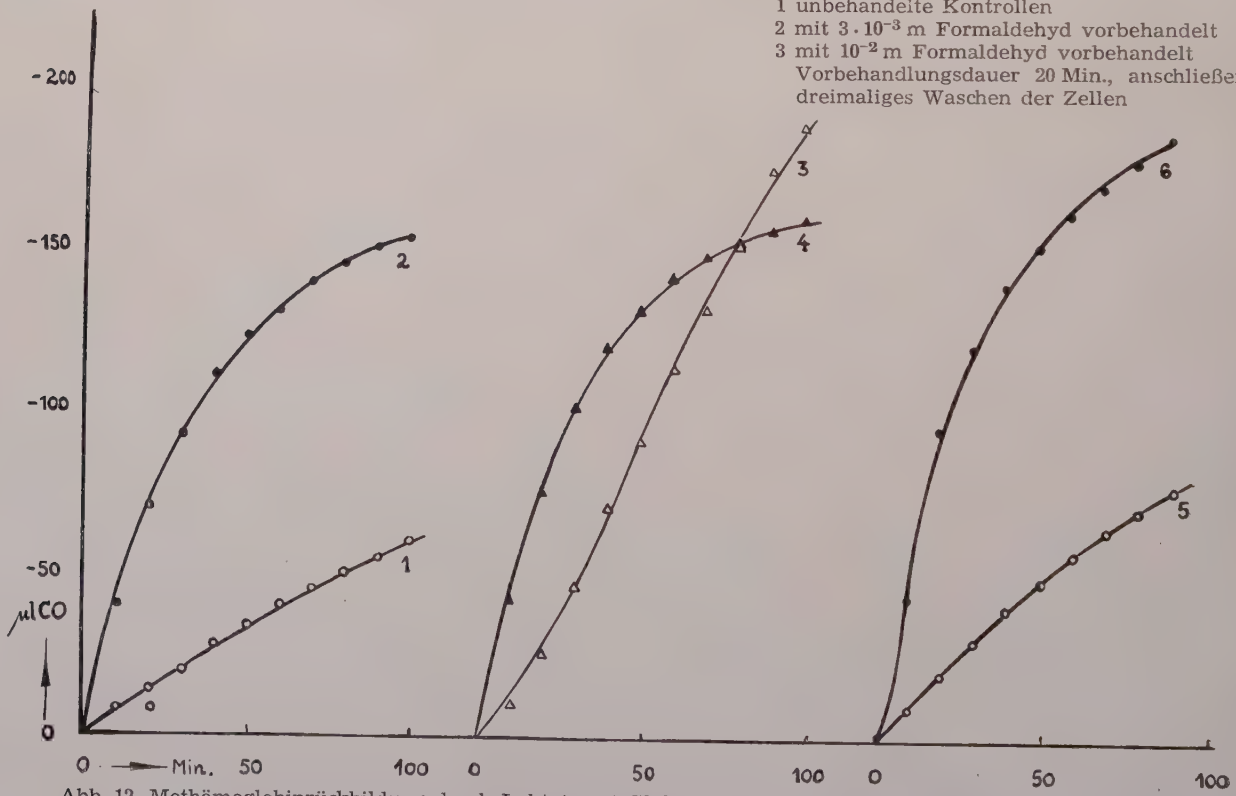


Abb. 12. Methämoglobinrückbildung durch Laktat und Glukose in Kaninchenerythrozyten mit Formaldehyd-Vorbehandlung (20 Min. mit 10^{-2} m Formaldehyd, anschließend dreimaliges Waschen der Zellen)

1 ohne Zusatz, unbehandelt 2 behandelt 3 Laktat 10^{-2} m, unbehandelt 4 behandelt
5 Glukose 10^{-2} m, unbehandelt 6 behandelt

suspension für die manometrische Messung der Methämoglobinrückbildung.

Wie aus der Abb. 11 hervorgeht, zeigen die unbehandelten Kontrollen eine CO-Bindung von 25 µl in den ersten 30 Minuten. Die mit $3 \cdot 10^{-3}$ m Formaldehyd vorbehandelten Zellen binden in der gleichen Zeit 57,5 µl CO. Die Behandlung mit 10^{-2} m Formaldehyd führt zu einer weiteren Steigerung der Methämoglobinreduktion in den Erythrozyten: Die CO-Bindung beträgt in 30 Minuten 97,5 µl. Die Rückbildungsgeschwindigkeit ist also viermal größer als in den unbehandelten Kontrollen.

In weiteren Versuchen wurde die Beeinflussung der Methämoglobinrückbildung durch Glukose oder Laktat nach Vorbehandlung mit Formaldehyd untersucht. Dabei wurden ähnliche Ergebnisse erzielt wie bei den Versuchen ohne Substratzusatz: Durch die Vorbehandlung kam es zu einer Steigerung der Rückbildungsgeschwindigkeit über das Maß hinaus, das durch die Substrate Glukose oder Laktat allein zu erzielen war.

Während in den unvorbehandelten Kontrollen mit 45 mg% Laktat eine CO-Bindung von 46 µl gemessen wurde, absorbierten die vorbehandelten Zellen bei Laktatzusatz in der gleichen Zeit 97 µl CO. Unter den gleichen Bedingungen bewirkten 150 mg% Glukose eine CO-Absorption von 30 µl, die nach Vorbehandlung mit Formaldehyd auf einen Wert von 117 µl CO in 30 Minuten anstieg. Aus dem Vergleich mit den Ansätzen ohne Substratzusatz (unbehandelt 20,5 µl CO/30 Min.; mit Formaldehyd vorbehandelt 91,5 µl CO/30 Min.) geht hervor, daß bei Verwendung von Glukose als Substrat ein additiver Effekt in Erscheinung tritt. Bei den Ansätzen mit Laktat als Substrat scheinen sich die Wirkung der Vorbehandlung und die Substratwirkung des Laktats gegenseitig zu stören.

Schon die ersten Versuche ließen eine Abhängigkeit der Rückbildungsbeschleunigung durch die Formaldehydvorbehandlung der Zellen von der angewandten Konzentration des Aldehyds erkennen. Zur Aufklärung dieser Beziehungen wurden Erythrozyten unter sonst gleichen Bedingungen mit Formaldehydlösungen verschiedener Konzentration vorbehandelt und anschließend ihre Rückbildungsaktivität manometrisch bestimmt. Die Auswertung der Anfangsgeschwindigkeiten der verschieden behandelten Zellproben ergab eine charakteristische Kurve; als Beispiel ist das Resultat eines solchen Versuchs wiedergegeben (Abb. 13).

Die Vorbehandlung der Zellen mit $3 \cdot 10^{-4}$ m Formaldehyd bewirkt eine eben erkennbare Steigerung der Rückbildungsgeschwindigkeit im Vergleich zu der Kontrolle ohne Vorbehandlung. Mit der Zunahme der zur Vorbehandlung verwandten Aldehydkonzentration kommt es aber zu einer beträchtlichen Verstärkung dieses Effektes, der schließlich bei Vorbehandlung mit 10^{-2} m Formaldehyd ein Maximum erreicht. Bei weiterer Erhöhung der Konzentration nimmt die Beschleunigung wieder ab, ist aber bei 10^{-1} m Formaldehyd noch immer sehr stark. Noch höhere Konzentrationen führen zur Hämolyse, so daß der Untersuchung in dieser Richtung eine Grenze gesetzt war.

Zur Deutung dieser Befunde könnten zweierlei Erklärungen herangezogen werden: Entweder kommt es durch die Formaldehydvorbehandlung zu einer Schädigung der Erythrozyten, wobei der Hemmung der Stoffwechselaktivität eine Phase vorübergehender Steigerung durch Freisetzen von gebundenem Substrat vorausgeht. Oder aber es handelt sich um eine echte Substratwirkung des Aldehyds. Dann müßte man annehmen, daß nach dem Auswaschen des freien Aldehyds aus den vorbehandelten Suspensionen ein Teil des gebundenen Aldehyds nach Resuspendierung wieder in Lösung geht, entsprechend den Befunden von Jung und Onnen (94), die ja eine teilweise Reversibilität der Formaldehydbindung an die Erythrozyten feststellen konnten. Auch die Ergebnisse von Scheler (164a) über die Methämoglobin-Formaldehyd-Verbindung würden eine Deutung in diesem Sinne erlauben.

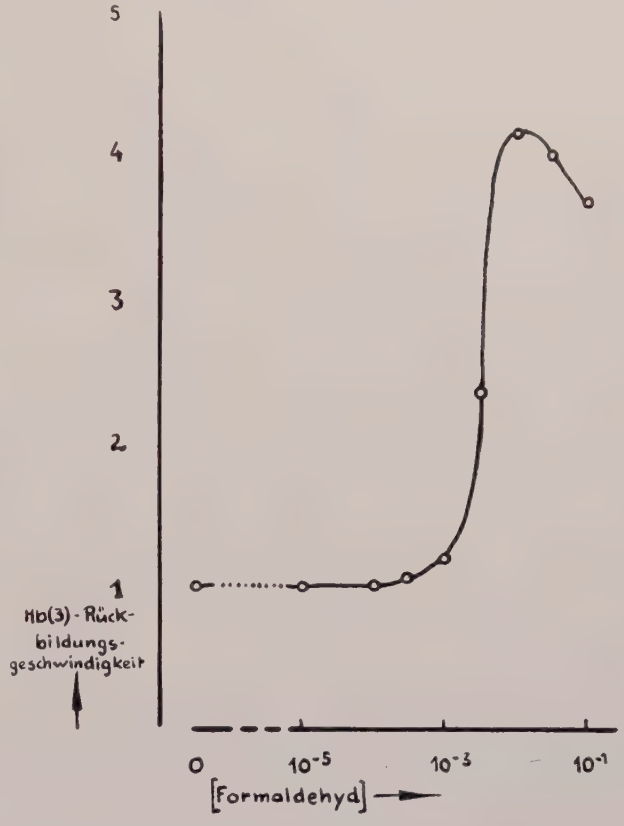


Abb. 13. Methämoglobinrückbildung in Kaninchenerythrozyten nach Vorbehandlung mit Formaldehyd. Vorbehandlungsdauer 20 Min., anschließend dreimaliges Waschen der Zellen

Bei den recht unübersichtlichen Konzentrationsverhältnissen, die durch das Waschen der vorbehandelten Zellen zur Entfernung des freien Aldehyds entstehen, schien es angebracht, die Versuchsanordnung zu variieren. Bei den folgenden Versuchen wurde auf das Auswaschen des Aldehyds verzichtet und die Methämoglobinrückbildung in Gegenwart des Formaldehyds bestimmt. Bei dieser Versuchsanordnung mußte auf die sonst übliche Messung der substratfreien Vorperiode vor Zukippen des Substrats aus der Seitenbirne des Reaktionsgefäßes verzichtet werden, da bei der Versuchstemperatur (37° C) der Formaldehyd sofort nach Einbringen der Gefäße in den Thermostaten aus der Seitenbirne in den Hauptraum diffundierte und ein Teil der Reaktion bereits vor dem endgültigen Zukippen in Gang kam. Damit war aber die einwandfreie Bestimmung einer substratfreien Periode nicht mehr möglich. Die Methämoglobinrückbildung ohne Formaldehydzusatz wurde deshalb stets in besonderen Kontrollansätzen gemessen, bei den Ansätzen mit Formaldehydzugabe wurde sofort nach Temperaturausgleich gekippt. Diese Versuchsanordnung lieferte im Prinzip die gleichen Ergebnisse wie die Experimente mit vorbehandelten Erythrozyten. Mit steigender Formaldehydkonzentration kommt es zu einem Anstieg der beschleunigenden Wirkung des Aldehyds auf die Methämoglobinrückbildung.

Der Ablauf der Methämoglobinrückbildung durch Formaldehydzusatz entspricht völlig demjenigen, der durch die Vorbehandlung erzielt worden war. Die Auswertung der Anfangsgeschwindigkeiten der Methämo-

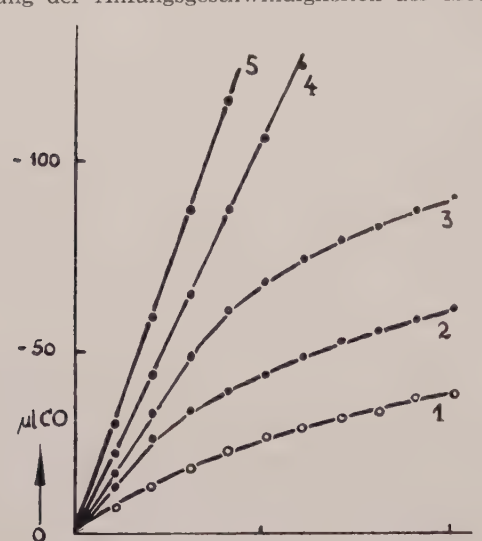


Abb. 14. Methämoglobinrückbildung durch Formaldehyd in Kaninchenerythrozyten

1 Kontrolle ohne Zusatz
2 Formaldehyd $2 \cdot 10^{-4}$ m
3 Formaldehyd $5 \cdot 10^{-4}$ m
5 Formaldehyd $5 \cdot 10^{-3}$ m
4 Formaldehyd 10^{-3} m

globinrückbildung nach Zusatz verschiedener Formaldehydkonzentrationen lieferte ebenfalls ein ähnliches Bild wie bei der Vorbehandlung mit Formaldehyd:

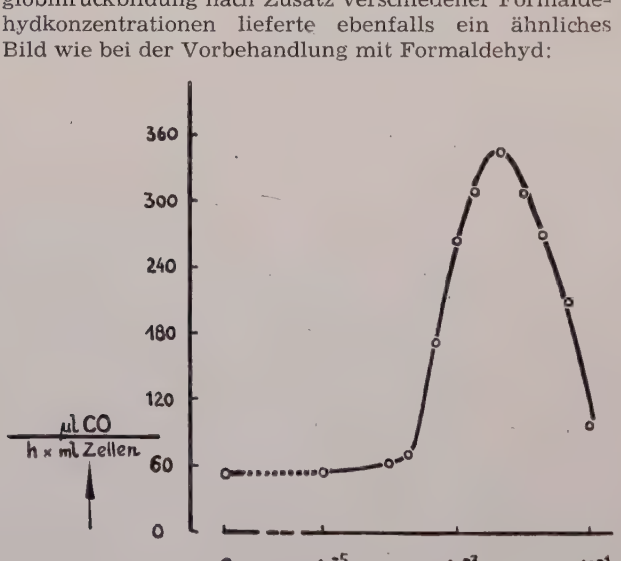


Abb. 15. Methämoglobinrückbildung durch Formaldehyd in Kaninchenerythrozyten. Abhängigkeit von der Konzentration des Aldehyds

Allerdings bestehen in einigen Punkten gewisse Unterschiede. Während das Maximum der Wirkung bei der Vorbehandlung mit 10^{-2} m Formaldehyd liegt, sind die höchsten Rückbildungsgeschwindigkeiten in Aldehydgegenwart bei Konzentrationen von etwa 3 bis $5 \cdot 10^{-3}$ m zu beobachten. Außerdem ist der Abfall der Wirkung nach Erreichen des Maximums bei den Versuchen in Formaldehydgegenwart viel stärker; bei einer Konzentration von 10^{-1} m ist die Methämoglobinrückbildung in der Regel geringer als in den formaldehydfreien Kontrollen, ja sie nähert sich oft sogar dem Nullwert. Die ganze Kurve der Konzentrationsabhängigkeit ist gewissermaßen in Richtung der niederen Konzentrationen verschoben. Diese Beobachtungen werden ohne weiteres verständlich, wenn man sich vergegenwärtigt, daß bei den Versuchen mit Formaldehydvorbehandlung ein Teil des Aldehyds durch das Waschen der Zellen entfernt wurde, so daß nach Resuspendierung und nach Einstellung des neuen Gleichgewichts zwischen gebundenem und freiem Aldehyd eine niedere Konzentration vorliegt als die bei der Vorbehandlung eingestellte.

Weitere Versuche sollten klären, ob es sich bei der beobachteten Wirkung des Formaldehyds auf die Methämoglobinrückbildung in roten Blutzellen um eine spezifische Eigenschaft dieses Aldehyds handelt, oder ob sie auch andere Aldehyde aufzuweisen haben. Zu diesem Zweck wurden die folgenden Verbindungen auf ihre rückbildungssteigernde Wirkung untersucht:

Aliphatische Verbindungen:

Formaldehyd	+++
Azetaldehyd	++
Propionaldehyd	+
Akrolein	(+)
Chloralhydrat	—

Aromatische Verbindungen:

Benzaldehyd	++
o-Hydroxy-benzaldehyd	++
p-Methyl-benzaldehyd	++
o-Methoxy-p-oxy-benzaldehyd	++

(Die Kreuze geben die Stärke der Rückbildungsbeschleunigung an).

Aus diesen Versuchen geht hervor, daß es sich bei der festgestellten Formaldehydwirkung um eine Eigenschaft dieser Verbindung handelt, die allen hier untersuchten Aldehyden zukommt, und daß es sich nicht um eine spezifische Eigenschaft des Formaldehyds handelt. Abgesehen von der unterschiedlichen Wirksamkeit der einzelnen Aldehyde bei Anwendung gleicher Konzentrationen, die auch auf unterschiedliche Diffusionsfähigkeit oder Oberflächenbesetzung der Membran zurückgeführt werden könnte, zeigen sich auch deutliche Unterschiede bei Betrachtung der Beziehungen der Konzentration zu der hervorgerufenen Rückbildungsbeschleunigung durch die einzelnen Aldehyde.

Die typische Kurve, wie sie bei allen Untersuchungen mit Formaldehyd in Erscheinung tritt, mit einem Maximum bei einer Konzentration von etwa $3 \cdot 10^{-3}$ m und einem folgenden steilen Abfall der Stoffwechselaktivität bei höheren Konzentrationen, wurde bei Azetaldehyd nicht gefunden. Diese Substanz zeigte vielmehr bis zu Konzentrationen von 10^{-1} m eine Wirkungszunahme, wenn sie auch in den höheren Konzentrationsbereichen weniger steil war als in den niederen. Bei Propionaldehyd ergab sich ein ähnliches Bild wie bei Formaldehyd, allerdings war die maximal erreichbare Beschleunigung der Methämoglobinrückbildung nicht so groß wie bei dem letzteren Aldehyd.

Die Beschleunigung durch Akrolein war nur sehr gering — betrug sie doch durchschnittlich nur 25% der substratfreien Rückbildungsgeschwindigkeit — im Gegensatz zu den 400% Beschleunigung durch Formaldehyd; außerdem waren die Beziehungen zwischen Konzentration und Wirkung sehr unübersichtlich. Bei

der starken Polymerisationsneigung dieser Verbindung und der Möglichkeit, auf Grund der Doppelbindung besondere Reaktionen eingehen zu können, schien es nicht ratsam, diesen Befunden im Hinblick auf die Fragestellung besondere Bedeutung beizumessen.

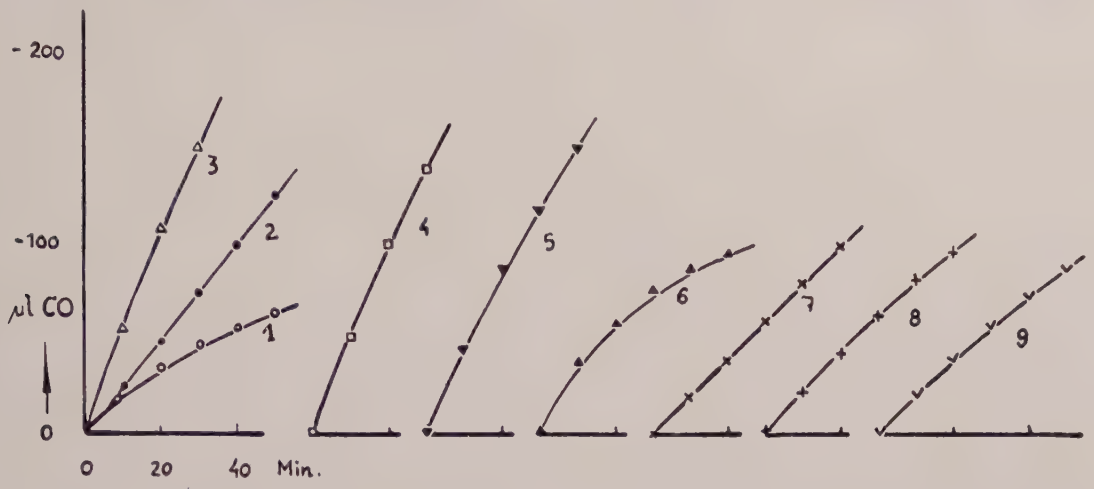


Abb. 16, Methämoglobinrückbildung durch verschiedene Aldehyde gleicher Konzentration in Kaninchenerythrozyten

1 ohne Substratzusatz
1 Glukose 10^{-2} m
3 Laktat 10^{-2} m
4 Formaldehyd
5 Azetaldehyd
6 Propionaldehyd
7 o-Methoxy-p-oxy-benzaldehyd
8 Benzaldehyd
9 p-Methylbenzaldehyd

Es erhebt sich nun die Frage, worauf die Steigerung der Methämoglobinrückbildung in den Erythrozyten durch die Aldehyde zurückzuführen ist.

Im Falle einer direkten Reaktion mit dem Methämoglobin müßten auch reine Methämoglobinlösungen diese Reaktion zeigen. Wie aber die Arbeiten von Scheler (164a) zeigen konnten, kommt es in einem solchen Fall zu keiner Reduktion des Methämoglobins, vielmehr bildet sich nur eine Methämoglobin-Formaldehyd-Verbindung.

Eine Aktivierung der endogenen Rückbildung ist wohl auch kaum anzunehmen, da die vorhandenen nicht auswaschbaren Substrate nicht ausreichen würden, um eine so weitgehende Rückbildung des Methämoglobins zu ermöglichen, wie es bei Formaldehydzusatz beobachtet werden kann.

Es handelt sich also allem Anschein nach um eine enzymatisch katalysierte Reduktion des Methämoglobins durch Aldehyde in den roten Blutzellen.

In einem solchen Falle könnte man folgende Reaktionsgleichung formulieren:

$$R-C\begin{matrix}\diagup O\\ \diagdown H\end{matrix} + H_2O + 2Hb(3) = R-C\begin{matrix}\diagup O\\ \diagdown OH\end{matrix} + Hb(2) + 2H^+.$$

Aus dieser Gleichung ergibt sich, daß je Mol verbrauchtem Aldehyd 2 Äquivalente Methämoglobin reduziert werden müßten. Als Reaktionsprodukt würde aus dem Aldehyd die entsprechende Säure entstehen. Um die Richtigkeit dieser Annahme zu überprüfen, wurde die stöchiometrische Beziehung zwischen der Methämoglobinreduktion und dem Formaldehydverbrauch in Suspensionen von Kaninchenerythrozyten untersucht.

Nach Jung und Scheler (94, 164a) wird ein Teil des Formaldehyds durch den Zellinhalt der Erythrozyten gebunden, und zwar auch von methämoglobinfreien Zellen. Diese Bindung des Aldehyds hat aber wahrscheinlich nicht mit dem Vorgang der Rückbildung direkt etwas zu tun. Um aber die während des enzymatischen Prozesses verbrauchte Formaldehydmenge einwandfrei zu bestimmen, war es notwendig, den gebundenen Aldehyd in Abzug zu bringen. Aus der Abb. 17 geht hervor, daß die Bindung des Formaldehyds durch den Zellinhalt bei Methämoglobin-Zellen und bei Hämoglobin-Zellen gleich groß ist. Diese Bindung erfolgt in der sehr kurzen Zeitspanne zwischen der Formaldehydzugabe und der ersten Probeentnahme.

Bei den methämoglobinhaltigen Erythrozyten kommt es dann zu einer weiteren Abnahme des Formaldehyds, während bei den methämoglobinfreien Zellen die Konzentration des freien Aldehyds im Suspensionsmedium im wesentlichen unverändert bleibt.

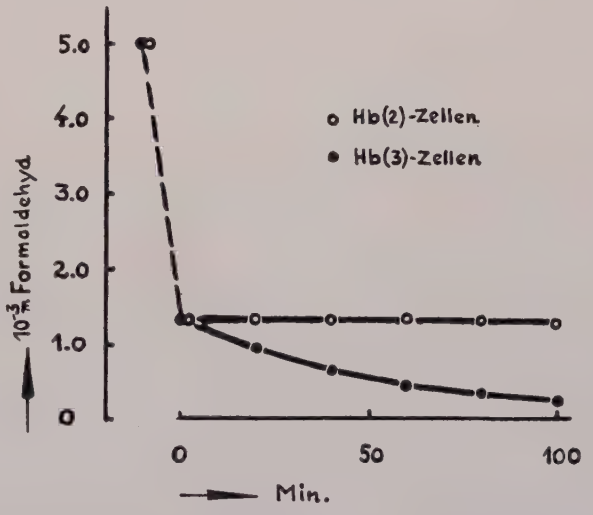


Abb. 17. Formaldehydbindung und -verbrauch von hämoglobinhaltigen und methämoglobinhaltigen Kaninchenerythrozyten

Vergleicht man nun das Ausmaß der Formaldehydabnahme in den methämoglobinhaltigen Zellsuspensionen mit der während dieser Zeit ablaufenden Methämoglobinrückbildung, so ergibt sich, daß der Verminderung des Formaldehyds eine gemäß der weiter oben angenommenen Reaktionsgleichung entsprechende Methämoglobinreduktion beobachtet werden kann. Das heißt also, daß die Bruttoreaktion dieser Formel entsprechend abzulaufen scheint.

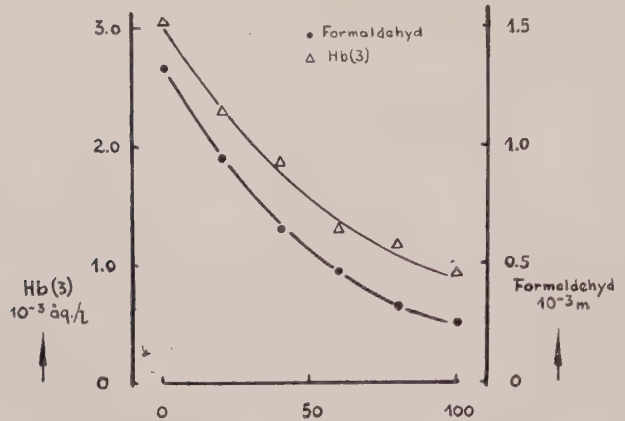


Abb. 18. Methämoglobinrückbildung und Formaldehydverbrauch in Kaninchenerythrozyten

Abb. 19. Papierchromatographische Identifizierung des Reaktionsproduktes bei der Methämoglobinrückbildung durch Salizylaldehyd in Kaninchenerythrozyten. Bestimmung im Suspensionsmedium (Umzeichnung)

1 Kontrolle: Salizylsäure
2 Suspensionsmedium einer Zellsuspension mit Hb(3)-haltigen Kaninchenerythrozyten und $5 \cdot 10^{-3}$ m Salizylaldehyd, eine Stunde nach Versuchsbeginn
3 Wie 2, aber zwei Stunden nach Versuchsbeginn
4 Wie 2, aber drei Stunden nach Versuchsbeginn
5 Kontrollsuspension ohne Salizylaldehyd, drei Stunden nach Versuchsbeginn

Die folgende Tabelle enthält die Ergebnisse einer Reihe von Versuchen, die zur Sicherung dieser Befunde durchgeführt wurden.

Versuch Nr.	Zahl der Proben	Hb (3) red. (60 Min.)	Formaldehyd verbraucht	Hb (3) / Formaldehyd
Fo 48	1	$1{,}849.10^{-3}$ m	$0{,}790.10^{-3}$ m	2,340
Fo 49	1	1,410	0,810	1,740
Fo 49a	1	1,770	0,860	2,056
Fo 50a	5	1,688	0,792	2,136
Fo 51a	4	1,794	0,833	2,098

Um die Frage nach dem Reaktionsprodukt des Aldehyds zu beantworten, das nach der oben gemachten Annahme die diesem entsprechende Säure sein sollte, wurde ein Aldehyd gewählt, dessen Säure leicht nachweisbar ist. Das trifft zum Beispiel für den Salizylaldehyd zu. Die Salizylsäure gibt mit Eisen-III-chlorid eine kräftige Farbreaktion. Diese Eigenschaft wurde nach papierchromatographischer Trennung von Aldehyd und Säure zur Entwicklung und Identifizierung der Salizylsäure auf dem Papierchromatogramm ausgenutzt. Wie aus der Umzeichnung eines solchen Papierchromatogramms hervorgeht, wird im Verlauf der Methämoglobinrückbildung in Kaninchenerythrozyten Salizylsäure gebildet, wenn der Suspension Salizylaldehyd zugesetzt worden war. In den Kontrollen ohne Salizylaldehyd läßt sich mit der angewandten Methode keine solche Farbreaktion erzielen.

Damit ist der Nachweis erbracht, daß im Verlauf der Rückbildungsbeschleunigung durch Aldehyde die entsprechenden Säuren als Reaktionsprodukte in Erscheinung treten. Somit gewinnt auch die oben aufgestellte Reaktionsgleichung ein hohes Maß an Wahrscheinlichkeit. Da es sich offensichtlich um eine enzymatisch katalysierte Reaktion handelt, taucht naturgemäß die Frage nach dem wirksamen Enzym auf.

5. Über die Eigenschaften einer Aldehyddehydrase in kernlosen Erythrozyten

Die Annahme eines enzymatischen Prozesses bei der Umwandlung von Aldehyden in die entsprechenden Säuren in methämoglobinhaltigen Erythrozyten legt es nahe zu überprüfen, inwieweit bereits bekannte Enzyme, insbesondere des glykolytischen Zuckerabbaus, bei dieser Reaktion mitwirken. Dabei muß vor allem an die Glyzerinaldehydphosphat-Dehydrase gedacht werden. Da dieses Ferment durch Jodessigsäure gehemmt wird, wurde die Wirkung dieses Inhibitors auf die Methämoglobinrückbildung durch Formaldehyd untersucht. Ebenso wurde auch der Einfluß von NaF auf diese Form der Methämoglobinrückbildung festgestellt.

Die Methämoglobinrückbildung durch Formaldehyd bleibt bei Zugabe von Jodessigsäure unverändert, im Gegensatz zu der Rückbildungsbeschleunigung durch Glukose, die durch diesen Inhibitor sehr stark gehemmt wird. Es ist danach kaum anzunehmen, daß die Glyzerinaldehydphosphat-Dehydrase das Enzym ist, das die Rückbildung durch Formaldehyd katalysiert. Auch NaF hat keinen Einfluß auf die Methämoglobinrückbildung durch Formaldehyd. Dieser Inhibitor greift an der durch die Enolase katalysierten Umwandlung von Phosphoglyzerinsäure zu Phosphobrenztraubensäure an (111). Diese Reaktion hat zwar keine direkte Beziehung zur Methämoglobinrückbildung, wie weiter vorn bereits erwähnt; durch den Angriff am glykoly-

tischen Zuckerabbau kann er aber doch diesen Stoffwechselprozeß hemmen. Eine Hemmbarkeit der Rückbildung durch Formaldehyd in Gegenwart von NaF würde also bedeuten, daß diese Rückbildungsform eng mit der Glykolyse verknüpft ist oder daß das wirksame Enzym einen ähnlichen Charakter wie die Enolase in bezug auf die aktivierenden Ionen besitzt. Wegen des

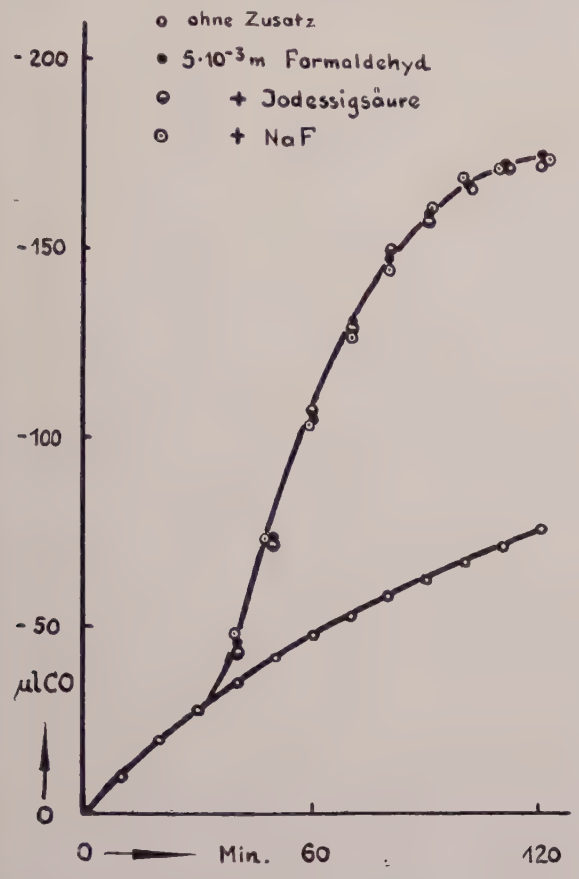


Abb. 20. Die Wirkung von Glykolysehemmstoffen auf die Methämoglobinrückbildung durch Formaldehyd in Kaninchenerythrozyten

negativen Ausfalls des Versuches, durch NaF eine Hemmung der Rückbildung durch Formaldehyd zu erzielen, können derartige Rückschlüsse nicht gezogen werden.

Die Rückbildung durch Laktat läßt sich durch hohe Konzentrationen Pyruvat hemmen [Kiese (100)]. Die Hemmung erfolgt durch Verschiebung des Reaktionsgleichgewichtes. Eine Hemmbarkeit der Rückbildung durch Formaldehyd in Pyruvatgegenwart dürfte auf Grund dieser Vorstellung nicht erfolgen, was auch durch Versuche bestätigt wurde. Es lag aber nahe, einen ähnlichen Hemmungsmechanismus wie bei dem Pyruvat-Laktat-System auch bei dem Aldehyd-Säure-System zu vermuten. Danach müßte eine hohe Ameisensäurekonzentration die Rückbildung durch Formaldehyd hemmen.

Nachdem sichergestellt war, daß Natriumformiat in den hohen Konzentrationen keinen Einfluß auf die endogene Rückbildung hat, wurde die Beeinflussung der Rückbildung durch Formaldehyd bei Formiatgegenwart geprüft. Die Ergebnisse zeigen, daß das Reaktionsprodukt, die Ameisensäure, ohne Einfluß auf die Rückbildung durch Formaldehyd ist.

Die Versuche, über die bisher berichtet wurde, waren alle an Kaninchenerythrozyten vorgenommen worden. Bekanntlich bestehen aber bezüglich der verschiedenen Rückbildungssysteme in den Erythrozyten beträchtliche Unterschiede zwischen den einzelnen Tierarten. Es wurde darum untersucht, inwieweit auch die Erythrozyten anderer Tiere in der Lage sind, Methämoglobin durch Aldehyde in den Zellen zurückzubilden. Aus diesem Grunde wählten wir 11 verschiedene Haus- und

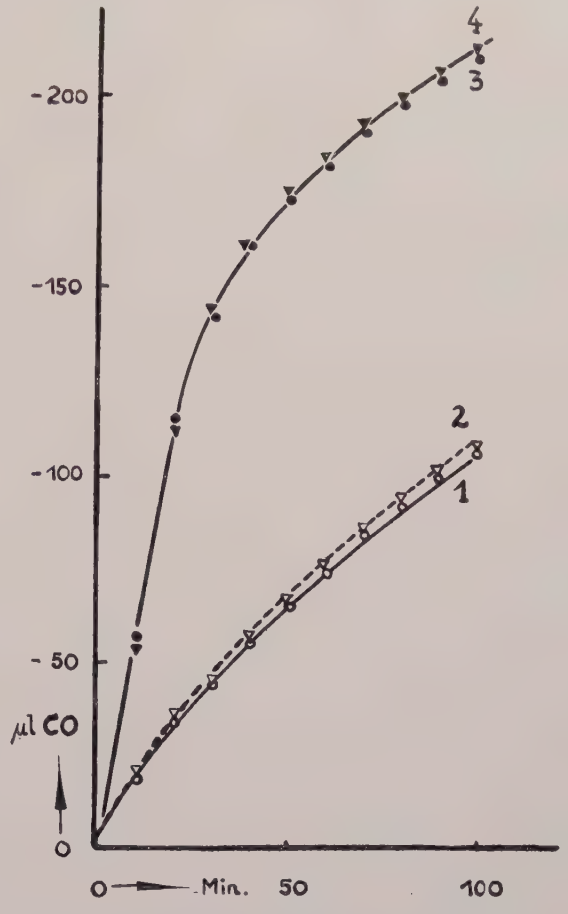
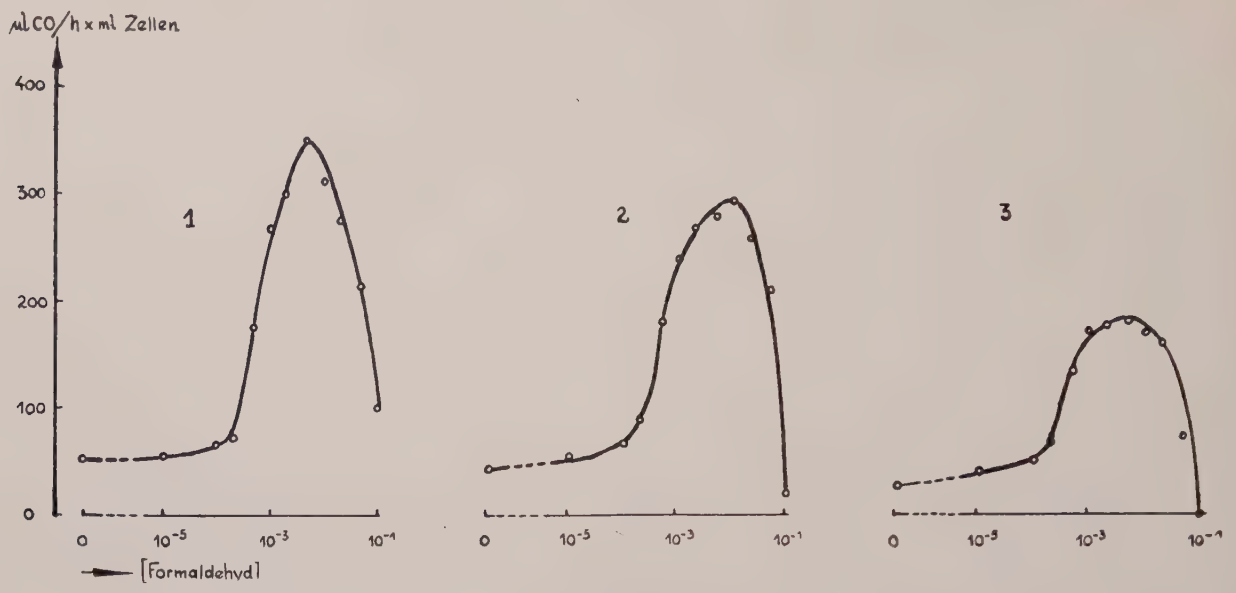


Abb. 21. Methämoglobinrückbildung durch Formaldehyd in Gegenwart von Formiat. Kaninchenerythrozyten

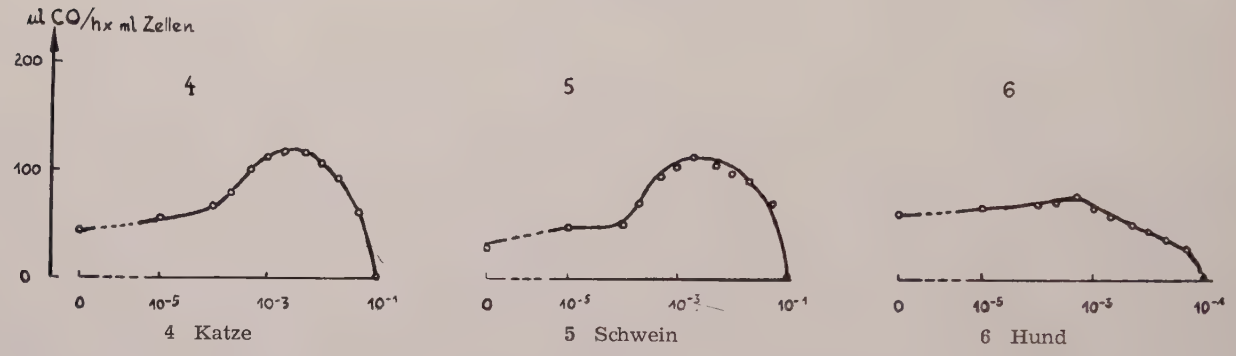
1 Kontrolle ohne Zusatz
2 Natriumformiat $5 \cdot 10^{-2}$ m
3 Formaldehyd 10^{-3} m
4 Formaldehyd 10^{-3} m und Natriumformiat $5 \cdot 10^{-2}$ m

Laboratoriumstiere aus, die im allgemeinen für experimentelle Untersuchungen zugänglich sind, und bestimmten die Aktivität der Rückbildung durch Formaldehyd. Von jeder Erythrozytenart wurde nicht nur die Rückbildungsbeschleunigung durch eine bestimmte Aldehydkonzentration ermittelt, sondern jeweils die Konzentrationsabhängigkeitskurve bestimmt. Dabei ergaben sich folgende Befunde:

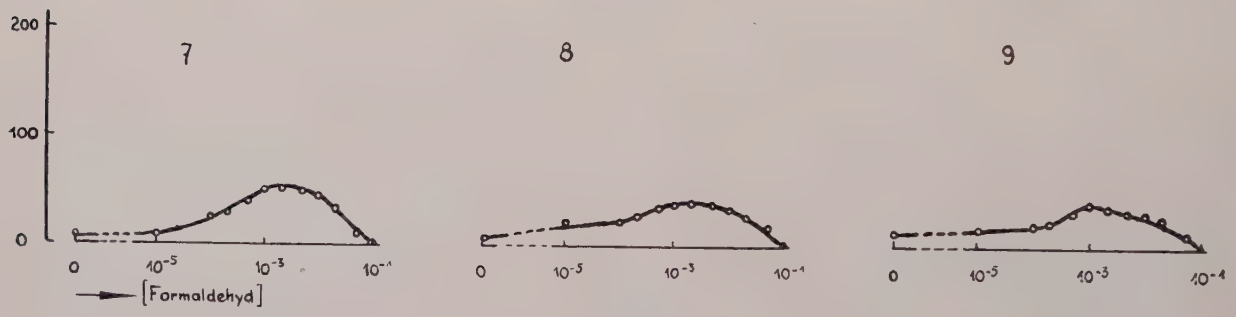
Neben Erythrozyten mit einer hohen Rückbildungsbeschleunigung durch Formaldehyd, wie zum Beispiel Kaninchen- und Meerschweinchenerythrozyten, gibt es solche, die keine Förderung der Methämoglobinrückbildung durch Formaldehyd erfahren. Das ist in ausgeprägter Weise bei Rinder- und Pferdeerythrozyten der Fall. Zwischen diesen Extremen liegen die roten Blutzellen, bei denen durch Formaldehyd eine mäßige Rückbildungsbeschleunigung erzielt werden kann. Aber auch in dieser mittleren Gruppe gibt es noch beträchtliche Unterschiede. So schließen sich die Erythrozyten der Ratte, der Katze und des Schweins mehr an die Gruppe mit hoher Rückbildungsaktivität an, während sich die Zellen von Ziege, Schaf, Hund und vom Men-



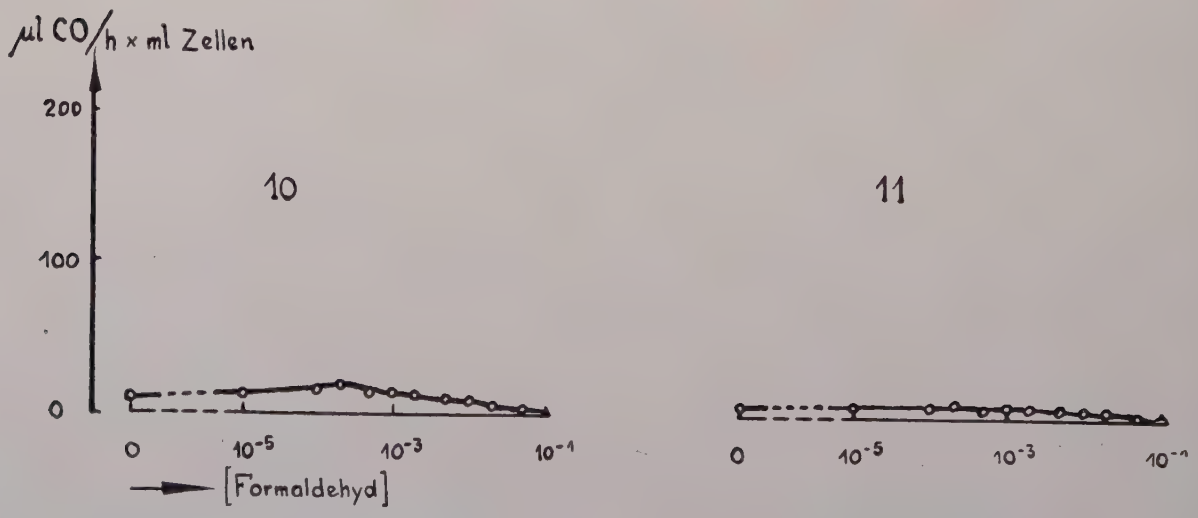
1 Kaninchen 2 Meerschweinchen 3 Ratte



4 Katze 5 Schwein 6 Hund



7 Schaf 8 Ziege 9 Mensch



10 Pferd 11 Rind

Abb. 22

schen mehr der Gruppe nähern, die keine Rückbildungsbeschleunigung durch Formaldehyd aufzuweisen hat. Auffällig ist, daß die Nagetiere in ihrer Mehrzahl sehr aktive Rückbildung durch den Aldehyd zeigen, während die Huftiere anscheinend gar nicht die dazu erforderlichen Enzymsysteme besitzen.

Weiterhin läßt sich an den vorliegenden Versuchsreihen zeigen, daß das Maximum der Formaldehydwirkung bei allen Tierarten, die überhaupt eine Beschleunigung der Methämoglobinrückbildung durch Formaldehyd in ihren Erythrozyten aufzuweisen haben, ungefähr bei der gleichen Formaldehydkonzentration liegt und mit dem bereits mitgeteilten Wert bei den Kaninchenerythrozyten übereinstimmt. Diese maximal wirksame Formaldehydkonzentration liegt bei 2 bis $5 \cdot 10^{-3}$ m.

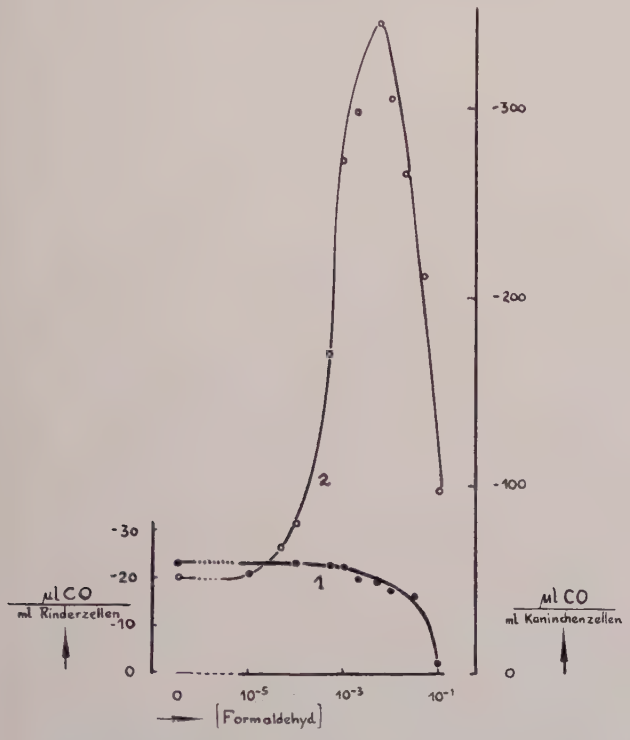


Abb. 23. Methämoglobinrückbildung durch Formaldehyd in Abhängigkeit von der Konzentration des Aldehyds

1 Rindererythrozyten 2 Kaninchenerythrozyten

Es lag die Vermutung nahe, daß der steile Wirkungsabfall nach Erreichen dieses Maximums auf die strukturbeeinflussende Wirkung des Formaldehyds zurückzuführen ist. Diese Annahme wird durch die Beobachtungen von Jung (94) gestützt, wonach deutliche, lichtoptisch feststellbare Strukturveränderungen durch $5 \cdot 10^{-2}$ m-Formaldehyd erhalten werden können.

Da nun bei Rinderzellen die Substratwirkung des Formaldehyds praktisch zu vernachlässigen ist, wenn überhaupt eine vorhanden ist, müßten sich an diesen Zellen am ehesten die Substratwirkung und die Strukturschädigung differenzieren lassen.

Wie aus der Konzentrationsabhängigkeitskurve der Rindererythrozyten hervorgeht, beginnt bereits bei der Formaldehydkonzentration von 10^{-3} m eine Verminderung der spontanen Rückbildungsgeschwindigkeit, die schließlich bei einer Konzentration von 10^{-1} m Formaldehyd in eine völlige Hemmung übergeht. Mit Hilfe dieses Ergebnisses, das in ähnlicher Weise auch bei Pferde- und Hundeerythrozyten erhalten werden kann, ist eine Deutung der Kurvenbilder der Erythrozytenarten möglich, die eine Rückbildungsbeschleunigung durch Formaldehyd zeigen. Man kann danach also annehmen, daß das Maximum bei etwa 2 bis $5 \cdot 10^{-3}$ m Formaldehyd durch die Interferenz der Substratwirkung und des schädigenden Einflusses des Formaldehyds zustande kommt. Darauf weist auch die Konzentrationsabhängigkeitskurve mit Azetaldehyd hin, die kein solches Maximum mit folgendem steilen Abfall der Wirkung aufweist, sondern bis zu einer Konzentration von 10^{-1} m eine Zunahme der beschleunigenden Wirkung auf die Methämoglobinrückbildung zeigt. Man kann deshalb wohl annehmen, daß die Übereinstimmung der Maxima der verschiedenen Erythrozytenarten auf den für Formaldehyd charakteristischen denaturierenden Einfluß auf die Proteine der roten Blutzellen zurückzuführen ist.

Um auszuschließen, daß die Unterschiede der Wirkung des Formaldehyds bei den verschiedenen Erythrozytenarten in bezug auf die Methämoglobinrückbildung durch Besonderheiten des Methämoglobins oder der

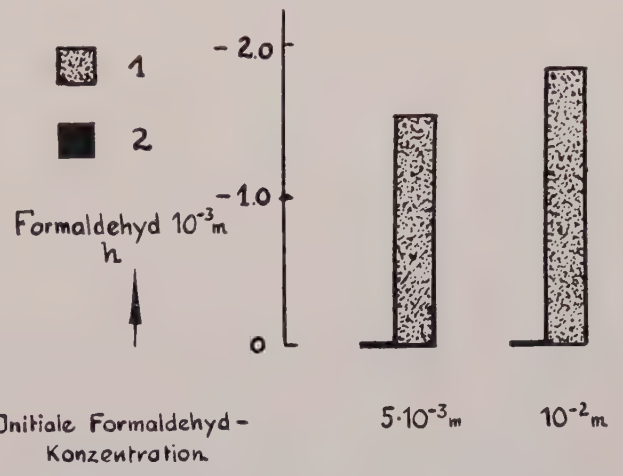


Abb. 24. Formaldehydverbrauch Hb(3)-haltiger Kaninchen- und Rindererythrozyten

1 Kaninchenerythrozyten 2 Rindererythrozyten

Rückbildungssysteme der einzelnen Zellarten zustande kommen, wurde zunächst der Formaldehydverbrauch methämoglobinhaltiger Kaninchen- und Rindererythrozyten bestimmt.

Während Kaninchenzellen bei einer Formaldehydkonzentration von $5 \cdot 10^{-3}$ m in einer 30%igen Suspension $1{,}53 \cdot 10^{-6}$ Mol/ml Suspension verbrauchen, konnte bei Rinderzellen nur ein Verbrauch von $0{,}03 \cdot 10^{-6}$ Mol/ml gemessen werden. Die anfängliche schnelle Bindung des Aldehyds geht in diese Werte nicht ein, da die ersten Bestimmungen erst nach Beendigung dieser Bindungsreaktion vorgenommen wurden. Daß diese Methämoglobin-Formaldehyd-Verbindung nicht unmittelbar mit dem Rückbildungsprozeß im Zusammenhang steht, geht auch aus der Tatsache hervor, daß auch die Rindererythrozyten diese anfängliche Bindungsreaktion zeigen, ohne daß es anschließend zur Methämoglobinrückbildung kommt. Das Ergebnis des Versuches zeigt aber auf jeden Fall, daß die Rinderzellen nicht wie die Kaninchenzellen in der Lage sind, Aldehyd zu oxydieren. Es wäre allerdings noch daran zu denken, daß den Zellen der erforderliche Wasserstoffakzeptor fehlt, der bei den Kaninchenzellen in Form des Methämoglobins vorhanden ist, wenn man auf der Annahme einer Verschiedenheit des Methämoglobins oder der Methämoglobinreduktionssysteme bestehen wollte. Aus diesem Grunde wurde

die Versuchsanordnung verändert. An Stelle des Methämoglobins wurde der Sauerstoff des Gasraums als Wasserstoffakzeptor genommen, indem Methylenblau als Überträger zugegeben wurde. Die Erythrozyten wurden in diesem Falle nicht mit Nitrit behandelt.

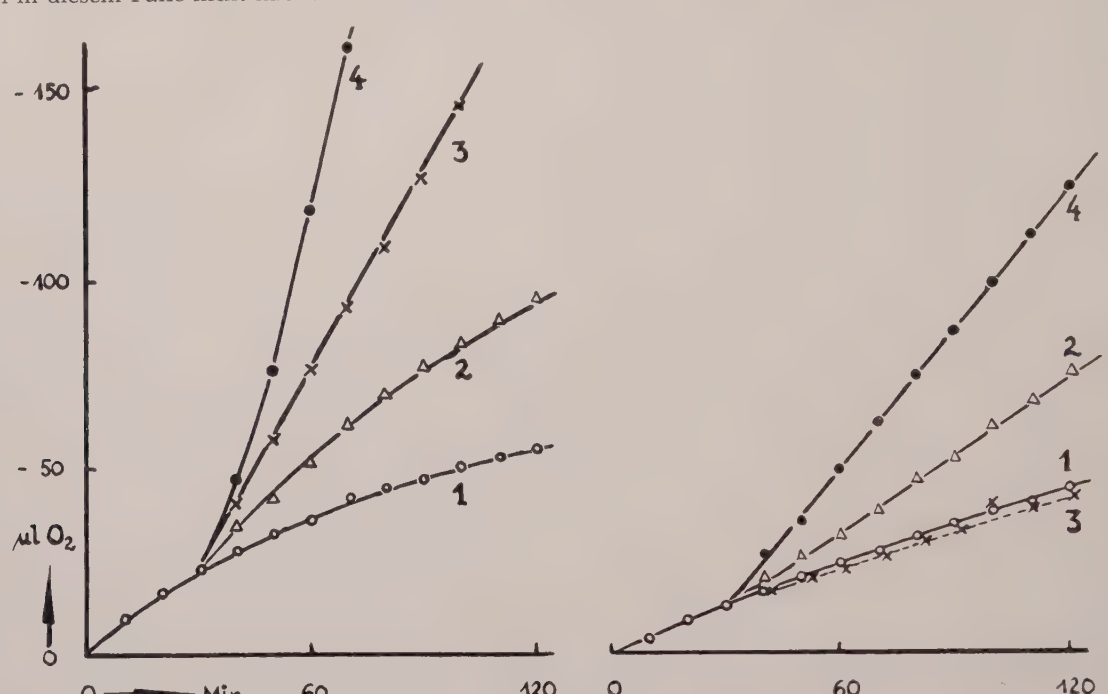


Abb. 25. Oxydation verschiedener Substrate im O_2-Methylenblau-System. Kaninchen- und Rindererythrozyten
1 Kontrolle ohne Substratzusatz 2 Laktat 10^{-2} m 3 Formaldehyd $5 \cdot 10^{-3}$ m 4 Glukose 10^{-2} m

Die Versuche mit Kaninchenerythrozyten ergaben auch unter diesen Bedingungen einen starken Stoffwechsel bei Verwendung von Formaldehyd als Substrat. Die Rindererythrozyten hingegen waren auch unter diesen Bedingungen nicht in der Lage, Formaldehyd zu verstoffwechseln.

Mit diesen Versuchen war ausgeschlossen worden, daß bei den Rinderzellen das Fehlen einer spezifischen Methämoglobinreduktase dafür verantwortlich zu machen ist, daß diese Zellen durch Formaldehyd kein Methämoglobin reduzieren können. Das Fehlen eines solchen diaphoraseähnlichen Faktors ist als Ursache deshalb auszuschließen, weil mit Glukose, aber vor allem auch mit Laktat als Substrat, ein Sauerstoffverbrauch im O_2-Methylenblau-System beobachtet werden kann. Danach ist anzunehmen, daß die Rindererythrozyten nicht über das Enzymsystem verfügen, das die Dehydrierung von Aldehyden ermöglicht. Zur weiteren Charakterisierung dieses Enzymsystems wurde in Anlehnung an frühere Versuche (118) die Wirkung von Formaldehyd auf die Methämoglobinrückbildung in Abhängigkeit von dem Zeitpunkt der Substratzugabe untersucht.

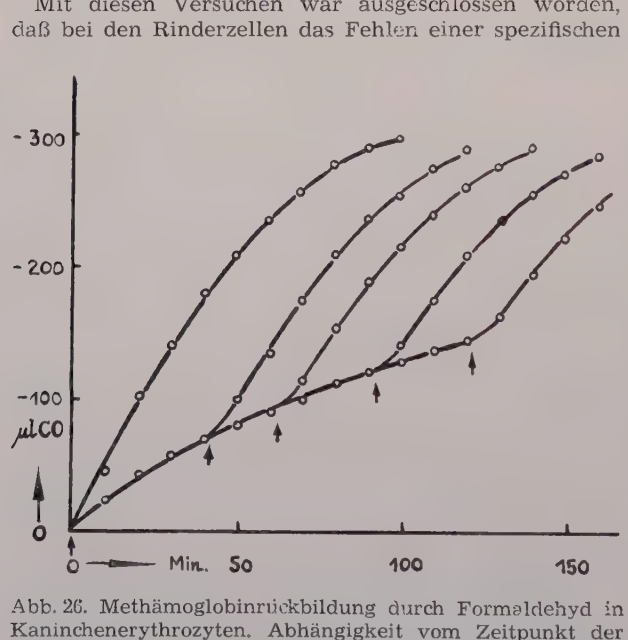


Abb. 26. Methämoglobinrückbildung durch Formaldehyd in Kaninchenerythrozyten. Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Substratzugabe. Zu den durch Pfeile markierten Zeitpunkten wurde den einzelnen Ansätzen Formaldehyd zugegeben

Im Gegensatz zu den Befunden mit Glukose als Substrat (s. S. 495), wo eine deutliche Abnahme der Wirkung bei späterer Zugabe auftritt, läßt sich nach 120 Minuten substratfreier Inkubation bei 37° C durch Formaldehyd die gleiche Rückbildungsbeschleunigung erzielen wie zu Beginn der Inkubation. Damit zeigt Formaldehyd das gleiche Verhalten wie Laktat. Genau wie die Methämoglobinrückbildung durch Laktat ist also auch die durch Formaldehyd unabhängig von Phosphorylierungsprozessen und der Glykolyse. Es konnten noch weitere Analogien gefunden werden. Sowohl durch Laktat als auch durch Formaldehyd ließ sich in den Erythrozyten eines Falles von idiopathischer Methämoglobinämie keine Methämoglobinreduktion herbeiführen. Da wegen der intakten Glykolyse dieser Zellen keine Inaktivität der Milchsäuredehydrase vorliegt, ist wohl mit dem Fehlen der DPN-spezifischen Methämoglobinreduktase zu rechnen. Das würde aber darauf hindeuten, daß für die vermutete Aldehyddehydrase ebenfalls DPN als Koenzym benötigt wird. Andere Versuche wiesen auf weitere Ähnlichkeiten der Rückbildung durch Laktat und durch Formaldehyd hin. In früheren Versuchen waren die Veränderungen der

Rückbildungssysteme während der Erythrozytenreifung untersucht worden (122). Es zeigte sich, daß die Aktivität der Rückbildung durch Glukose im Verlauf der Reifung stark abnimmt, während die durch Laktat unverändert bleibt. Versuche mit Formaldehyd als Substrat ergaben, daß auch dieses Rückbildungssystem in Ery-

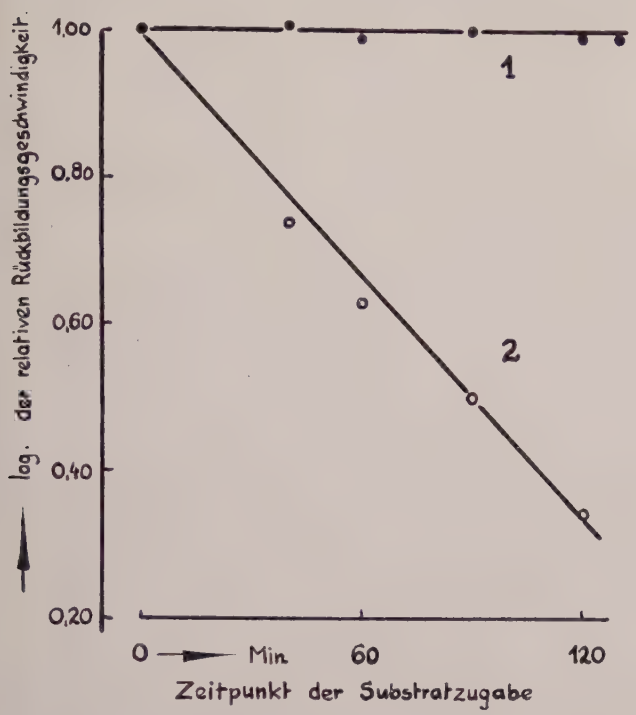


Abb. 27. Methämoglobinrückbildung durch Formaldehyd und Glukose in Kaninchenerythrozyten. Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Substratzugabe

1 Formaldehyd $5 \cdot 10^{-3}$ m 2 Glukose 10^{-2} m

throzyten und Retikulozyten gleich aktiv ist. Auch dieser Befund würde nach unseren Überlegungen auf gleichartige Methämoglobinreduktasen und Koenzyme für das Laktat- und für das Formaldehyd-System hinweisen.

Nachdem bereits eine Reihe von charakteristischen Eigenschaften des Fermentsystems festgestellt worden war, das die Reduktion von Methämoglobin in Erythrozyten durch Formaldehyd und andere Aldehyde ermöglicht, wurden Versuche durchgeführt, um die Lokalisation des Enzyms und die Rolle von Koenzymen aufzuklären.

Zunächst galt es festzustellen, ob die Reduktion des Methämoglobins durch Formaldehyd auch in Vollhämolysaten vor sich geht. Bekanntlich sind die normalen Rückbildungsprozesse in Vollhämolysaten nicht zu beobachten, da durch die Hämolyse eine Spaltung der notwendigen Pyridinnukleotide erfolgt und auch die Phosphorylierung durch Spaltung des ATP gehemmt ist. Wie Versuche ergaben, ist auch die Methämoglobinrückbildung durch Formaldehyd nach Hämolyse der Erythrozyten nicht mehr vorhanden.

Dieses Ergebnis führt zu der Vermutung, daß für die Methämoglobinreduktion durch Formaldehyd ebenfalls jene Koenzyme notwendig sind, die bei der Hämolyse unwirksam werden, wie für die anderen Rückbildungssysteme. Es wäre dabei vor allem an die Pyridinnukleotide zu denken, die für die Dehydrierungsvorgänge allgemein von großer Bedeutung sind. Um die Spaltung dieser Koenzyme zu verhindern, wurde dem Wasser, mit dem die Hämolyse der Erythrozyten vorgenommen wurde, Nikotinsäureamid zugesetzt, das durch kompe-

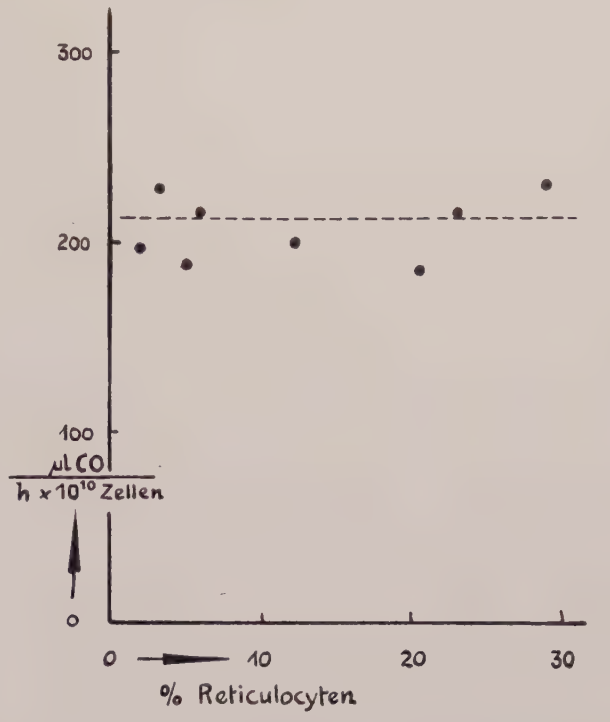


Abb. 28. Methämoglobinrückbildung durch Formaldehyd in Zellsuspensionen mit verschiedenem Gehalt an Retikulozyten. Kaninchenerythrozyten

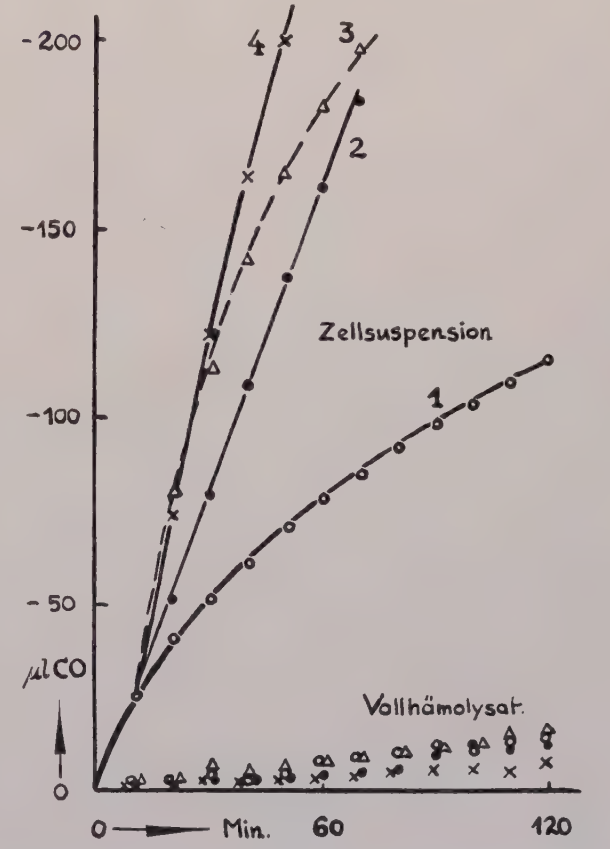


Abb. 29. Methämoglobinrückbildung in Kaninchenerythrozyten und in Vollhämolysat aus den gleichen Zellen. Keine Abtrennung der Stromata und kein Zusatz von Nikotinsäureamid

1 Kontrolle ohne Zusatz 2 Glukose 10^{-2} m
3 Laktat 10^{-2} m 4 Formaldehyd $5 \cdot 10^{-3}$ m

titive Hemmung der Nukleotidasen die Spaltung von DPN und TPN verhinderte. In einem so hergestellten Hämolysat war sowohl die Rückbildung durch Laktat als auch die durch Formaldehyd wieder zu beobachten. In weiteren Versuchen wurde die Spezifität des vermuteten Enzyms für eines der beiden Pyridinnukleotide festgestellt, wobei auch die Lokalisation des Ferments aufgeklärt werden konnte. An Stelle des vorher verwendeten Vollhämolysats wurde ein stromafreies Hämolysat, von uns „Zytoplasma" genannt, genommen. Die folgenden Untersuchungen wurden ausschließlich mit diesem Zytoplasma durchgeführt.

Orientierende Versuche ergaben nämlich, daß die Rückbildungsaktivität der Stromata allein äußerst gering ist und daß der weitaus größte Teil der Rückbildungsaktivität der Zelle im Zytoplasma vorgefunden wird.

Die Zugabe von Formaldehyd zu Zytoplasma aus methämoglobinhaltigen Erythrozyten führt zu keiner Reduktion des Methämoglobins. Die Zugabe von DPN allein führt zu geringen Rückbildungsvorgängen, die wohl auf die auch im Zytoplasma vorhandenen endogenen Substrate zurückzuführen sind. Wird DPN und Formaldehyd zugegeben, so kommt es zu einer starken Methämoglobinrückbildung, wie sie auch von den intakten Erythrozyten her schon bekannt ist. Ganz im Gegensatz dazu ist die Zugabe von TPN und Formaldehyd wirkungslos. Damit ist der enzymatische Charakter der Rückbildung durch Formaldehyd ebenso wie die Natur des notwendigen Koenzyms bewiesen.

Durch Zugabe unterschiedlicher Mengen von DPN zu den einzelnen Ansätzen bei konstanter Formaldehydkonzentration läßt sich die Abhängigkeit der Methämoglobinrückbildung durch Formaldehyd von der DPN-Konzentration zeigen.

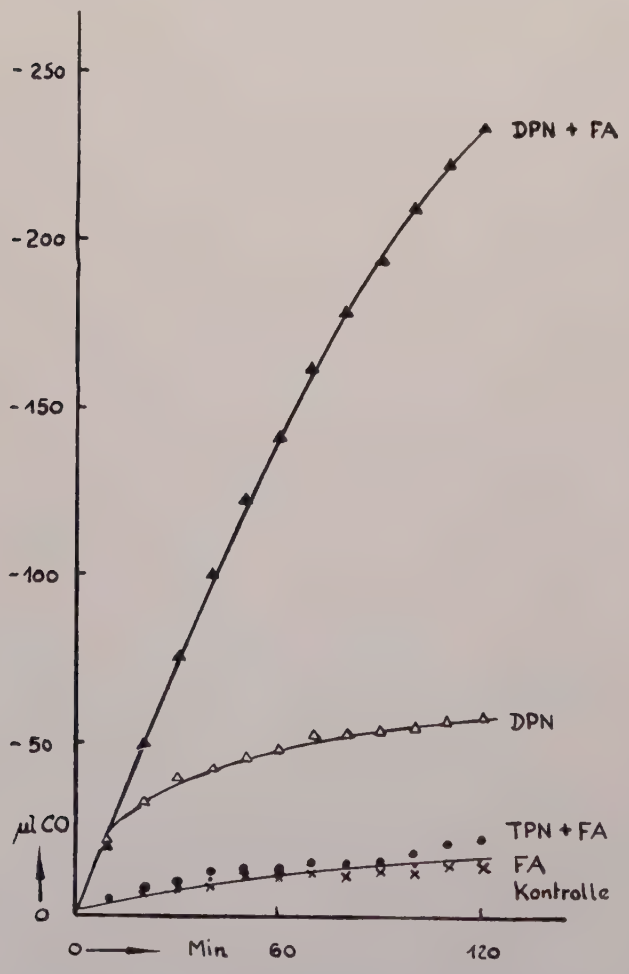


Abb. 30. Methämoglobinrückbildung im Zytoplasma aus Kaninchenerythrozyten. DPN-Spezifität der Rückbildung durch Formaldehyd

1 Kontrolle ohne Zusatz
2 Formaldehyd $5 \cdot 10^{-3}$ m
3 Formaldehyd $5 \cdot 10^{-3}$ m und TPN 20 µg/ml
4 DPN 15 µg/ml
5 Formaldehyd $5 \cdot 10^{-3}$ m und DPN 15 µg/ml

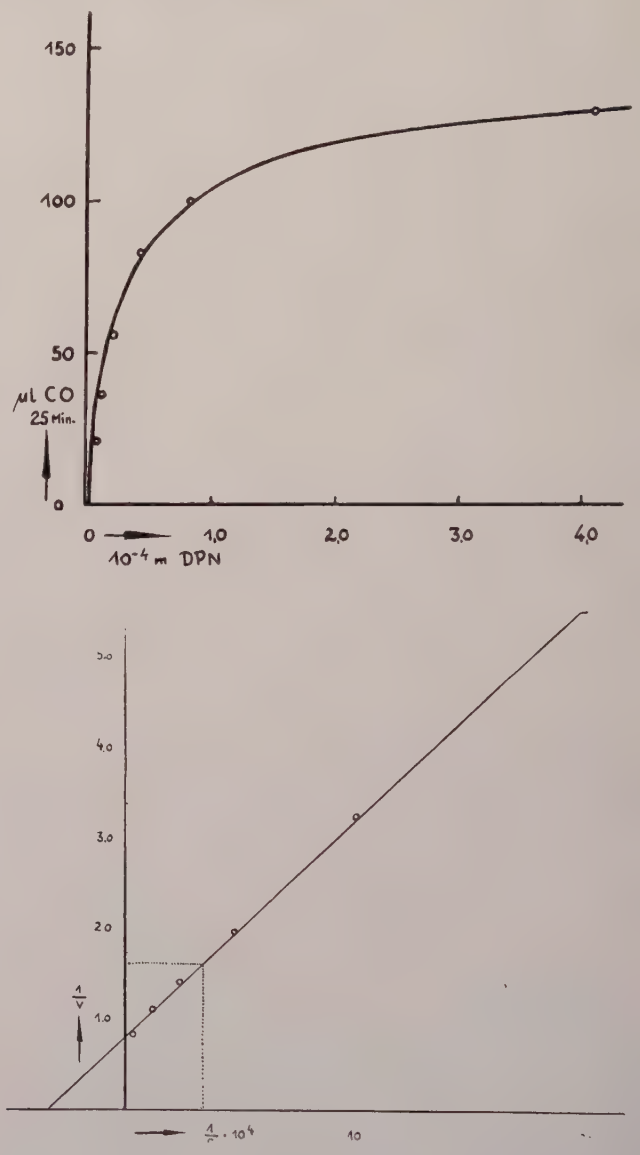


Abb. 31. Methämoglobinrückbildung durch Formaldehyd im Zytoplasma von Kaninchenerythrozyten in Abhängigkeit von der DPN-Konzentration

Zur Beseitigung der zelleigenen Pyridinnukleotide wurde das Hämolysat vor der Abtrennung der Stromata und Zufügung des Nikotinsäureamids 30 Min. bei 37° C inkubiert.

Bei Auswertung dieser Versuche durch Auftragen der reziproken Werte der Rückbildungsgeschwindigkeit gegen die reziproken Werte der DPN-Konzentration ergibt sich eine Gerade. Ihr Schnittpunkt mit den Achsen des Koordinatensystems ermöglicht die Bestimmung der Reaktionskonstanten des untersuchten

Enzyms mit DPN und beträgt in unseren Versuchen an Kaninchenzytoplasma

$$K_M = 3{,}1 \text{ bis } 3{,}3 \cdot 10^{-5} \text{ m DPN}.$$

Die Versuche, die Substratabhängigkeit der Reaktion in Erythrozyten zu messen, waren auf gewisse Schwierigkeiten gestoßen, da neben der Substratwirkung des Aldehyds auch eine andere, schädigende Wirkung zutage trat, die eine Wirkungsabnahme bei höheren Formaldehydkonzentrationen zur Folge hatte. In diesen Versuchen konnte nicht geklärt werden, ob diese Schädigung auf eine Strukturbeeinflussung und damit verbundene Hämolyse zurückzuführen ist oder ob es sich um eine Schädigung der Rückbildungssysteme handelt.

Die Untersuchung der Rückbildung in Abhängigkeit von der Formaldehydkonzentration im Zytoplasma erlaubt die Ausschaltung der Hämolysefolgen. Die Versuche ergaben aber das eindeutige Ergebnis, daß auch unter diesen Bedingungen ein Maximum der Formaldehydwirkung bei etwa $5 \cdot 10^{-3}$ m auftritt, dem ein starker Wirkungsabfall bei höheren Konzentrationen folgt. Demnach ist dieser Wirkungsabfall nicht durch Strukturschädigung zu erklären, sondern Schädigung der Rückbildungssysteme oder des Methämoglobins selbst.

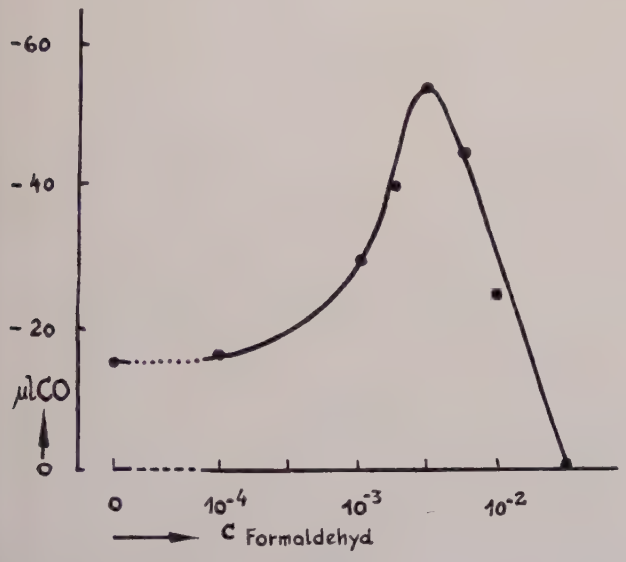


Abb. 32. Methämoglobinrückbildung im Zytoplasma von Kaninchenerythrozyten. Abhängigkeit von der Formaldehydkonzentration
15 µg DPN/ml

Die DPN-Abhängigkeit des vorliegenden Enzyms macht es von vornherein unwahrscheinlich, daß es vom Typ einer Xanthinoxydase ist. Dennoch wurde die Oxydation von Xanthin durch Zytoplasma im O_2-Methylenblau-System untersucht.

Wie zu erwarten, findet keine Oxydation von Xanthin in dem untersuchten System statt.

Zur weiteren Charakterisierung des Enzyms wurde die Aktivität bei verschiedenen Wasserstoffionenkonzentrationen gemessen. Dabei ergab sich ein Maximum der Wirkung des Formaldehyds bei einem p_H von 7,5. Bei etwa 6,4 und 8,3 wird nur noch 50% der Aktivität gemessen.

Anschließend seien noch die Ergebnisse mitgeteilt, welche die Untersuchung der thermischen Resistenz der Aldehyddehydrase im Vergleich zu derjenigen der Milchsäuredehydrase ergaben.

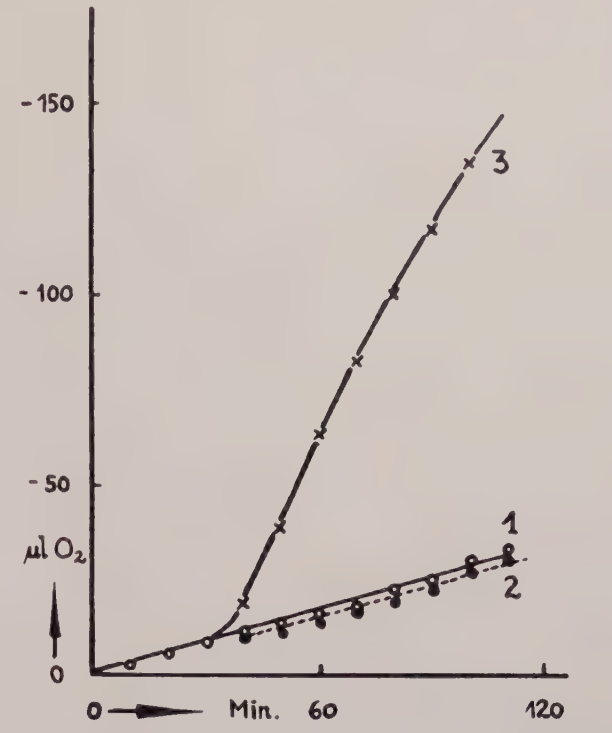


Abb. 33. Oxydation von Xanthin und Formaldehyd im Zytoplasma von Kaninchenerythrozyten
O_2-Methylenblau-System
1 Kontrolle ohne Zusatz
2 Xanthin 10^{-3} m
3 Formaldehyd 10^{-3} m

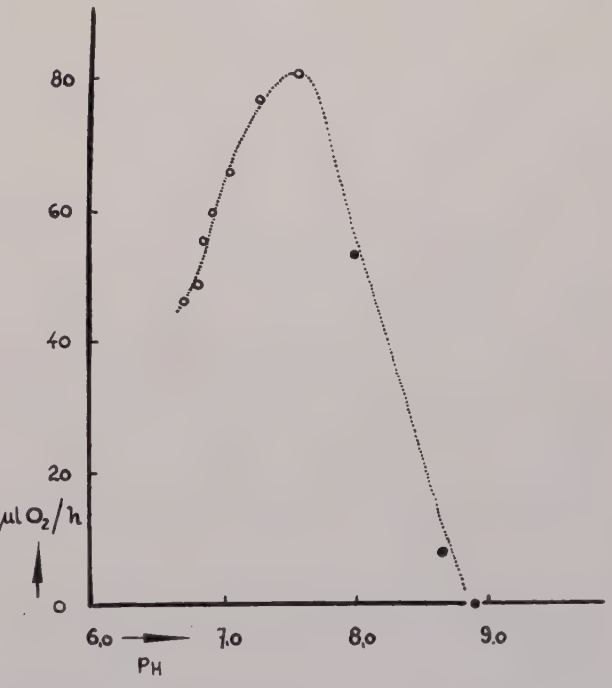


Abb. 34. Formaldehydoxydation im Zytoplasma von Kaninchenerythrozyten. Abhängigkeit von der Wasserstoffionen-Konzentration
O_2-Methylenblau-System
p_H 6,5 bis 7,5 Phosphatpuffer
p_H 7,5 bis 9,0 Boratpuffer

Wie aus den Abbildungen hervorgeht, ist die Aldehyddehydrase stabiler als die Milchsäuredehydrase. Die zehnminutige Erhitzung auf 50° C hat nur eine ge-

ringe Aktivitätsabnahme zur Folge, während die Milchsäuredehydrase anscheinend durch diese Behandlung schon inaktiviert wird. Bei Erhitzung auf 60° C ist auch die Fähigkeit zur Formaldehydoxydation verlorengegangen, die Inaktivierungstemperatur für die Aldehyddehydrase liegt also zwischen 50° und 60° C.

suchung der Methämoglobinrückbildung in Rindererythrozyten, weil bei diesen Zellen der andere Faktor der Formaldehydwirkung — die Stoffwechselwirkung — nicht in Erscheinung tritt. Es zeigt sich dabei ganz deutlich, daß Konzentrationen von 10^{-3} m und darüber eine schädigende Wirkung auf den Stoffwechsel der

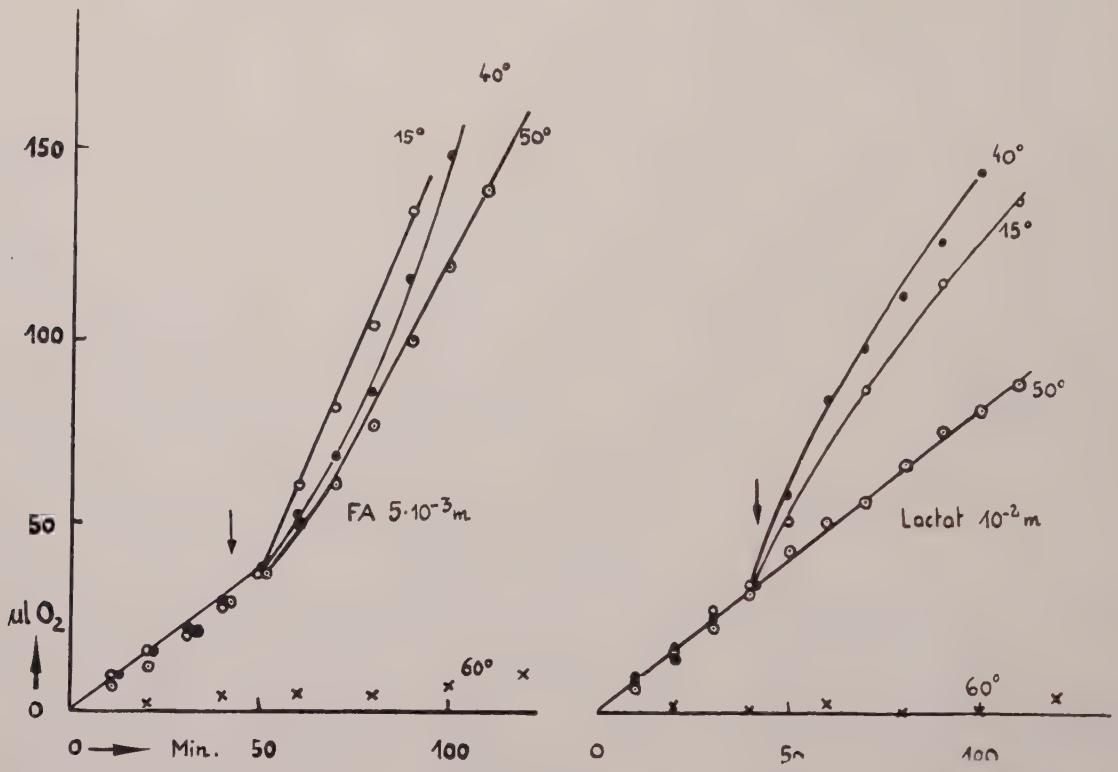


Abb. 35. Resistenz der Aldehyddehydrase und der Milchsäuredehydrase gegenüber thermischer Schädigung. O_2-Methylenblau-System. Zytoplasma bei verschiedenen Temperaturen 10 Min. inkubiert. Anschließend zentrifugiert zur Entfernung ausgefällter Zytoplasmabestandteile. Das Überstehende wurde für die manometrischen Messungen verwandt

6. Besprechung der Ergebnisse

An Hand der vorliegenden Ergebnisse konnte gezeigt werden, daß die Wirkung des Formaldehyds auf rote Blutzellen aus zwei verschiedenen Komponenten zusammengesetzt ist: Die eine ist zurückzuführen auf die Eigenschaft des Formaldehyds, mit NH- oder NH_2-Gruppen zu reagieren. Dadurch kommt es zu Veränderungen funktioneller und struktureller Art der Proteine, die ja reich an solchen Gruppen sind. Diese Wirkung des Formaldehyds ist mannigfaltig und unübersichtlich, je nach der Bedeutung der reagierenden Endgruppen und der betroffenen Proteine. Die Arbeiten von Wilbrandt (207) über die Beeinflussung der Hämolyse durch Formaldehydbehandlung der Erythrozyten stellen vor allem den Angriff des Aldehyds an der Zellmembran in den Vordergrund der Betrachtung, während die Untersuchungen von Jung (94), Scheler (164a) und Guthe (56) die Bindung an den Blutfarbstoff und deren Folgen beinhalten. Aus der Arbeit von Jung (94) geht außerdem auch die Wirkung auf die Membran deutlich hervor. Auf jeden Fall kommt es durch Formaldehyd in Konzentrationen über 10^{-3} m zu Veränderungen der physiologischen Eigenschaften der behandelten Proteine, die zum Teil beträchtlichen Umfang annehmen können, wie aus zahlreichen Untersuchungen hervorgeht, auf die hier noch einmal hingewiesen sein soll (1—4, 9, 14, 51, 53, 132, 141, 168, 183, 199, 206). Auch aus den vorliegenden Ergebnissen läßt sich eine solche Beeinflussung der normalen Funktion der Erythrozyten ableiten. Besonders deutlich wird das bei der Unter-

Zellen besitzen, eine Zahl, die in guter Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Bernheim (14) und Watts (199) niedriger ist als der von Jung (94) angegebene Wert, bei dem die ersten licht- und elektronenoptisch erfaßbaren Veränderungen an den Erythrozyten beobachtet werden können.

Die andere Komponente der Formaldehydwirkung auf die roten Blutzellen ist eine direkte Stoffwechselwirkung und kommt in der starken Beschleunigung der Methämoglobinrückbildung zum Ausdruck. Sie entspricht größenordnungsmäßig der Wirkung der physiologischen Substrate auf die Rückbildungsvorgänge. Man kann sogar sagen, daß die Substratwirkung des Formaldehyds stärker ist als die der Glukose und des Laktats, wenn man bedenkt, daß die maximale Rückbildungsbeschleunigung infolge der gleichzeitig wirksam werdenden schädigenden Komponente nicht voll zur Entfaltung kommen kann.

Die nähere Untersuchung der Methämoglobinrückbildung durch Formaldehyd ergibt, daß diese Reaktion von einem Enzym katalysiert wird, das die Oxydation von Aldehyd zur entsprechenden Säure unter gleichzeitiger Hydrierung von DPN ermöglicht. Die Reaktionsgleichung wäre also folgendermaßen zu formulieren:

$$R-C\begin{matrix}\diagup O\\ \diagdown H\end{matrix} + H_2O + DPN = R-C\begin{matrix}\diagup O\\ \diagdown OH\end{matrix} + DPN \cdot H + H^+.$$

Das entstandene DPN·H wird dann in weiteren Reaktionen, wie weiter vorn beschrieben, zur Reduk-

tion des Hb(3) benutzt, genau wie bei der Rückbildung durch Laktat beispielsweise. Wie die Versuche in stromafreiem Hämolysat ergaben, ist das Enzym DPN-spezifisch, TPN kann nicht als Koenzym dienen. Es handelt sich bei dem in Frage kommenden Enzym um eine Aldehyddehydrase; außer Formaldehyd erwiesen sich noch eine Reihe anderer aliphatischer und aromatischer Aldehyde als wirksame Substrate. Ein Ferment vom Typ der Xanthinoxydase konnte ausgeschlossen werden, da Xanthin als Substrat unwirksam war, auch die DPN-Abhängigkeit macht es schon unwahrscheinlich. Das Enzym ist relativ stabil gegenüber thermischer Schädigung. Es ist weder durch Jodessigsäure, noch durch NaF hemmbar, eine Hemmung durch p-Chlormerkuribenzoat wird erst bei so hohen Konzentrationen des Inhibitors beobachtet, daß eine spezifische Hemmung auszuschließen ist. Eine Hemmung durch das entstehende Reaktionsprodukt, etwa wie beim Milchsäuredehydrasesystem durch Brenztraubensäure, im vorliegenden Falle durch die aus dem Aldehyd entstehende Säure, konnte nicht beobachtet werden. Das weist auf eine Irreversibilität der Reaktion hin.

Das p_H-Optimum der Aldehyddehydrierung in den Erythrozyten liegt bei einem p_H von 7,5, also etwa bei einer Wasserstoffionenkonzentration, die allgemein für das physiologische Milieu der Erythrozyten angenommen wird.

Die vergleichende Untersuchung an den Erythrozyten verschiedener Tierarten ergab sehr unterschiedliche Aktivitäten. Dabei ergab sich eine Übereinstimmung mit den anderen untersuchten Rückbildungssystemen, von kleineren Abweichungen abgesehen. Die stärkste Rückbildungsbeschleunigung fand sich bei Kaninchen, Meerschweinchen und Ratten, wenn Formaldehyd als Substrat gegeben wurde. Diese Tierarten zeigen aber auch bei Anwendung der anderen Substrate die stärkste Hb(3)-Reduktion in den Zellen. Vollständig zu fehlen scheint die Aldehyddehydrase bei den Erythrozyten von Rind und Pferd. Diese Zellen zeichnen sich auch sonst durch eine geringe Stoffwechselaktivität aus. In diesem Zusammenhang sei auch erwähnt, daß die Rindererythrozyten im Gegensatz zu den anderen kernlosen Erythrozytenarten nicht die sonst so charakteristische 2,3-Diphosphoglyzerinsäure enthalten [Rapoport (148)].

Bei Vergleich der Aldehyddehydrase aus Erythrozyten mit ähnlichen Enzymen anderer Organe ergeben sich einige Unterschiede. Bei der von Black (16) untersuchten Aldehyddehydrase aus Hefe kann sowohl DPN als auch TPN als Koenzym dienen, auch hat dieses Ferment eine größere Affinität zu Azetaldehyd als zu Formaldehyd. Schließlich liegt das p_H-Optimum mehr im Alkalischen, bei 8,75.

Eine andere Aldehyddehydrase wurde von Rakker (144) aus Rinderleber gewonnen und zeigt wie die hier Beschriebene eine DPN-Spezifität. Allerdings ist auch bei diesem Rinderleber-Enzym Azetaldehyd als Substrat wirksamer als Formaldehyd, während Benzaldehyd nicht als Substrat dienen kann, im Gegensatz zu den Beobachtungen an den Erythrozyten. Auch liegt wie bei dem von Black beschriebenen Ferment das Maximum der Aktivität im Alkalischen, nämlich bei einem p_H von 9,3. Die von Seegmiller (166) beschriebene Aldehyddehydrase aus Hefe kommt für einen Vergleich nicht in Frage, da sie absolut TPN-spezifisch ist.

Strittmater und Ball (180a) haben eine Formaldehyddehydrase aus Küken- und Rinderleber isolieren können. Sie benötigt als Kofaktor reduziertes Glutathion. Ihr p_H-Optimum liegt zwischen 7,9 und 8,2, also ziemlich nahe dem für die Aldehyddehydrase aus Erythrozyten festgestellten Wert. Das Gleichgewicht liegt sehr weit auf seiten der Ameisensäure. Eine so strenge Substratspezifität konnte von uns nicht festgestellt werden, was aber auch daran liegen kann, daß wir nicht mit aufgereinigten Fermentpräparaten gearbeitet haben. Auf jeden Fall ist aber auch im vorliegenden Enzym aus Erythrozyten Formaldehyd das wirksamste Substrat. In Übereinstimmung mit den eigenen Untersuchungen ist auch die DPN-Spezifität des Enzyms von Strittmater. Es wäre die Aufgabe weiterer Untersuchungen, die mögliche Übereinstimmung beider Enzyme aufzuklären.

Wenn auch die Untersuchungen über die Aldehyddehydrase in den roten Blutzellen ihren Ausgangspunkt in den Untersuchungen über die Methämoglobinrückbildung in den Erythrozyten hatten, so ist doch nach allem, was bisher über den Stoffwechsel des Formaldehyds und über die Methämoglobinrückbildung bekannt ist, kaum anzunehmen, daß die Bedeutung dieses Enzyms in seinen Beziehungen zu den Rückbildungsprozessen zu suchen ist. Die Konzentration an freien Aldehyden im Blut ist nur sehr gering im Vergleich zu den Konzentrationen an Glukose und Laktat, die als die physiologischen Substrate der Methämoglobinrückbildung angesehen werden können. Größere Aldehydkonzentrationen spielen lediglich in toxikologischer Hinsicht eine gewisse Rolle, so zum Beispiel bei der Anwendung von Tetraäthylthiuramdisulfid (Antabus) als Mittel gegen chronischen Alkoholismus. Dabei soll es durch Hemmung der Azetaldehyddehydrase zur Anhäufung von Azetaldehyd beim Abbau des Alkohols kommen. Allerdings hemmt dieser Inhibitor auch noch andere wichtige Enzyme, wie die Glyzerinaldehyddehydrase (129, 134). Auch bei der Vergiftung mit Methanol sollen die toxischen Erscheinungen auf die Anhäufung von Formaldehyd und Ameisensäure zurückzuführen sein (97, 98, 140). Die bei dieser Vergiftung auftretenden Intermediärprodukte deuten darauf hin, daß Methanol, Formaldehyd und Ameisensäure vom Organismus abgebaut werden können. Wahrscheinlich führen lediglich die bei einer Intoxikation auftretenden hohen Konzentrationen zu einer Schädigung. Welche Bedeutung diese Verbindungen mit einem Kohlenstoffatom aber unter physiologischen Bedingungen besitzen, blieb aus methodischen Gründen lange Zeit unklar. In neuerer Zeit aber konnte festgestellt werden, daß der „1-C-Metabolismus", wie diese Stoffwechselprozesse in ihrer Gesamtheit kurz genannt werden, doch erhebliche Bedeutung besitzt. Die Tatsache, daß nur sehr niedrige Konzentrationen der in Frage kommenden Substanzen gefunden werden, spricht nicht dagegen, da die stationären Konzentrationen noch nichts über den Durchsatz aussagen können. Bei der hohen Reaktivität der 1-C-Verbindungen ist es nur zu verständlich, daß sich Stoffwechselprozesse herausgebildet haben, welche die stationären Konzentrationen klein halten. Das Auftreten der Ameisensäure ist schon recht früh festgestellt worden. So bei dem Abbau von Glukose im tierischen Organismus (181), im Urin (22) und im Blut (41).

Annison (10) bestimmte die flüchtigen Fettsäuren im Schafblut und fand, daß die Ameisensäure 10—30% der Gesamtsäuren ausmacht. Aber auch das Auftreten von Formaldehyd konnte nachgewiesen werden; der Formaldehyd wurde als Dimedonderivat isoliert (114). In der Folge wurde eine Reihe von intermediären Stoffwechselvorgängen aufgedeckt, bei denen entweder Formaldehyd direkt nachgewiesen wurde oder bei denen es als Substrat diente oder bei denen zumindest das Auftreten dieser Verbindung zur Erklärung des Reaktionsablaufes postuliert wurde. Vor allem scheint der

Formaldehyd auch bei der Übertragung und dem Einbau von Methylgruppen eine gewisse Rolle zu spielen.

Unter den vielen verschiedenartigen Reaktionen, die in diesem Zusammenhang genannt werden könnten, soll hier nur die Porphyrinsynthese genannt werden, weil zu diesem Vorgang noch die engsten Beziehungen denkbar wären, wenn von einer Formaldehyddehydrase in Erythrozyten gesprochen wird. Die Untersuchungen von Shemin und seinen Mitarbeitern über die Bildung von Protoporphyrin und Porphyrin in Erythrozyten führten den Autor zu der Feststellung, daß dabei Formaldehyd als Intermediärprodukt auftreten müsse. Bei der schädigenden Wirkung dieses Aldehyds in höheren Konzentrationen würde ein Enzym mit den hier beschriebenen Eigenschaften eine Störung des intermediären Stoffwechsels durch dieses Reaktionsprodukt sehr gut verhindern können.

Inwieweit noch andere Deutungsmöglichkeiten bestehen, müßten weitere Untersuchungen zeigen, wenn man nicht von vornherein annehmen will, daß es sich lediglich um ein rudimentäres Enzym handelt. In diesem Zusammenhang bleibt auch noch die Frage nach der Ursache der unterschiedlichen Verteilung des Enzyms auf die verschiedenen Erythrozytenarten offen.

7. Methodik

Präparation von methämoglobinhaltigen Erythrozyten

Das Blut wurde den Versuchstieren durch Herzpunktion entnommen und defibriniert. Nach dem Herunterzentrifugieren der zellulären Elemente wurden das Plasma und die oberste, leukozytenhaltige Schicht der Zellen abgehoben. Sodann wurden die Erythrozyten mit dem gleichen Volumen eisgekühlter 2,4%iger Natriumnitritlösung versetzt und gut gemischt. Dabei schlägt ihre rote Farbe in ein tiefes Schokoladenbraun um: Der in den Zellen enthaltene Blutfarbstoff ist zu Methämoglobin oxydiert worden. Nach Meier (123) reagiert bei einem p_H von 5,0 ein Mol Nitrit mit einem Äquivalent Hämoglobin nach der Gleichung:

$$4NaNO_2 + 4Hb \cdot O_2 + 2H_2O = 4NaNO_3 + 4Hb \cdot OH + O_2$$

Bei einem alkalischen p_H wird allerdings eine mehrfache Menge Nitrit benötigt. Die Reaktion des Blutfarbstoffs mit Nitrit machten auch noch andere Autoren zum Gegenstand ihrer Untersuchungen (117). Die roten Blutzellen scheinen durch die Behandlung mit Nitrit nach allen bisherigen Erfahrungen nicht wesentlich geschädigt zu werden, sofern die Einwirkung nicht zu lange dauert (131). Bei längerer Einwirkung kommt es allerdings zu Veränderungen der Eigenschaften der Zellen (107, 45). So soll die mechanische und osmotische Resistenz vermindert werden. Auch in eigenen Untersuchungen hat das Auftreten der Hämolyse bei den nitritbehandelten Erythrozyten bei länger dauernden Versuchen einen begrenzenden Faktor dargestellt. Darüber hinaus werden auch noch andere Eigenschaften der roten Blutzellen verändert. Das zeigt sich bei der Herstellung von stromafreien Hämolysaten aus nitritbehandelten Zellen. Selbst durch Zentrifugieren in einer hochtourigen Winkelzentrifuge und Ansäuern der Hämolysate und mehrmaliges Waschen der behandelten Zellen vor der Hämolyse ließen sich die Stromata nur sehr schwer abtrennen, im Gegensatz zu den unbehandelten Erythrozyten, wo die Abtrennung stets leicht gelang. Auch hier zeigten sich wieder Unterschiede zwischen den Erythrozyten der verschiedenen Tierarten.

Trotz aller dieser Umstände ist die angegebene Methode die schonendste Art, methämoglobinhaltige Zellen herzustellen. Nach dem Zumischen des Nitrits bleiben die Erythrozyten noch 5 Minuten im Eisbad stehen und werden dann dreimal mit dem späteren Suspensionsmedium gewaschen. Je nach Tierart enthalten sie dann 60 bis 100% Methämoglobin.

Bestimmung des Methämoglobingehaltes und des Gesamthämoglobingehaltes

Kolorimetrische Bestimmung nach Havemann, Jung und Issekutz (62) auf der Grundlage der Absorptionsdifferenz zwischen Methämoglobin und Methämoglobin-Zyanid-Komplex in einem Bereich, in dem die Absorption des Hämoglobins minimal ist. Kolorimeter: Eigenbau des Instituts für Pharmakologie und Toxikologie der Humboldt-Universität zu Berlin nach Angaben von Prof. Dr. Jung. Filter: Interferenzfilter der Firma VEB Schott & Gen., Jena, mit einem Durchlässigkeitsmaximum bei 631 mμ.

Messung der Methämoglobinrückbildung in Erythrozyten

1. Kolorimetrisch nach der oben angegebenen Methode.
2. Manometrisch. Das Prinzip der manometrischen Messung beruht auf der Bindung von Kohlenmonoxyd durch das bei der Methämoglobinreduktion entstehende Hämoglobin.

In allen Versuchen wurde als Suspensionsmedium für die serum- und substratfrei gewaschenen Erythrozyten eine isotone Salzlösung gewählt, die aus einem Teil m/15 Phosphatpuffer nach Sörensen vom p_H 7,4 und vier Teilen 0,155 m NaCl-Lösung bestand.

Kohlenmonoxyd wurde durch Eintropfen von reiner Ameisensäure in konzentrierte Schwefelsäure von 90° C jeweils frisch hergestellt. Das sich entwickelnde Kohlenmonoxyd wurde vor dem Einleiten in die Reaktionsgefäße mit Pyrogallol und Lauge gewaschen.

Die Absorption des Kohlenmonoxyds wurde mit der direkten manometrischen Methode bestimmt und diente als Maß der Methämoglobinrückbildung. Dabei wurde zugrunde gelegt, daß ein Äquivalent Hämoglobin ein Mol Kohlenmonoxyd bindet.

Als Reaktionsgefäße dienten in der Regel Kegelgefäße mit Zentraleinsatz zur Aufnahme von 0,3 ml 10%iger KOH mit Filtrierpapierröllchen und einer Seitenbirne zur Aufnahme von 0,3 ml Substratzusatz. In den Hauptraum des Gefäßes wurden stets 3,0 ml der Erythrozytensuspension einpipettiert. Die Suspension enthielt bei den Erythrozyten mit großer Stoffwechselaktivität 30% Zellen, bei den Versuchen mit weniger aktiven Zellen wurden Suspensionen angewandt, die bis zu 50% Erythrozyten enthielten.

Die Substrate wurden, von besonderen Versuchsanordnungen abgesehen, sofort nach Herstellung der Temperaturkonstanz zugegeben. Eine längere Vorperiode wurde zumeist vermieden, da bei der Flüchtigkeit vieler Aldehyde schon eine Substratwirkung vor dem Einkippen durch Überdestillation auftrat.

Messung der Substratoxydation in Erythrozyten

In den Versuchen, in denen nicht Methämoglobin als Wasserstoffakzeptor dienen sollte, wurde an Stelle von Kohlenmonoxyd Sauerstoff für den Gasraum gewählt. Als Wasserstoffüberträger diente Methylenblau in einer Konzentration von 10^{-4} m. Im übrigen war die Versuchsanordnung die gleiche wie bei den Untersuchungen mit Kohlenmonoxyd.

Untersuchungen in Hämolysaten

Um die Abhängigkeit der untersuchten Reaktionen von der intakten Zellstruktur festzustellen und um die Wirkung von nicht permeierenden Substanzen, wie

etwa DPN odere TPN, zu überprüfen, mußten Versuche in Hämolysaten durchgeführt werden. Bei der Herstellung eines Hämolysats gehen eine Reihe von Veränderungen an den Stoffwechselfaktoren der Erythrozyten vor sich, die bei der Herstellung der Hämolysate berücksichtigt werden müssen. Insbesondere ist hier an die Spaltung der Pyridinnukleotide zu denken (5, 75, 76, 77, 114a, 115). Im Verlauf unserer Untersuchungen hat sich die folgende Vorschrift als besonders schonend erwiesen, wobei gleichzeitig eine gute Abtrennung der Stromata auch unter den erschwerenden Bedingungen der vorhergehenden Nitritbehandlung der Erythrozyten ermöglicht wird.

Nitritfrei gewaschene Zellen werden mit dem gleichen Volumen eisgekühlten destillierten Wassers versetzt, das Gemisch verrührt, um eine schnelle Hämolyse zu erreichen, und Nikotinsäureamid in der Menge zugesetzt, um eine Endkonzentration von 10^{-2} m herzustellen. Nachdem das Gemisch 5 Minuten im Eisbad gestanden hat, um die Hämolyse vollständig zu machen, werden 9,5 Vol. dieses Hämolysats mit 0,5 Vol. einer m/3-KH_2PO_4-Lösung unter Rühren vermischt. Anschließend erfolgt die Abtrennung der Stromata durch Zentrifugieren. Nach Abheben des Überstehenden, von uns „Zytoplasma" genannt, wird dieses mit einer m/3-Na_2HPO_4-Lösung auf ein p_H von 7,4 eingestellt. In dieser Form wurde das stromafreie Hämolysat für die manometrischen Messungen verwandt. Zu Vergleichszwecken wurde von jeder Hämolysatpräparation der Gesamthämoglobingehalt kolorimetrisch bestimmt.

Bestimmung des Formaldehyds

Zur Feststellung der Formaldehydbindung und des Formaldehydverbrauchs der Erythrozyten wurde die Methode von Nash (133) benutzt. Sie beruht auf der Kondensation von Formaldehyd mit Azetylazeton und Ammoniak zu einer zyklischen Verbindung von kräftiger gelber Farbe. Kolorimetrische Bestimmung mit einem Interferenzfilter mit Durchlässigkeitsmaximum bei 415,3 mμ.

Bestimmung der Milchsäure

Es wurde die kolorimetrische Methode nach Kubowitz angewandt.

Bestimmung der Brenztraubensäure

Hierbei gelangte die Methode nach Friedemann und Haugen zur Anwendung.

Papierchromatographische Identifizierung der Salizylsäure

Zur Ermittlung der Reaktionsprodukte der Aldehydoxydation in den Erythrozyten wurde ein Aldehyd gewählt, dessen Säure leicht bestimmbar ist. Das ist bei der Salizylsäure der Fall, die mit Eisen-III-chlorid eine kräftige Farbreaktion gibt. Da auch der Aldehyd mit diesem Reagenz eine Färbung gibt, wurde zunächst eine papierchromatographische Auftrennung des Erythrozytenextrakts vorgenommen. In anderen Versuchen wurde die Bestimmung und Identifizierung in dem Suspensionsmedium vorgenommen. Als Lösungsmittel für die Papierchromatographie diente n-Butanol und 1,5 n NH_4OH 5:1. Die Entwicklung der Flecken erfolgte mit 0,5% $FeCl_3$ in 10% HCl, und zwar nach Trocknen der Chromatogramme durch Besprühen mit diesem Reagenz.

An dieser Stelle möchte ich meinem verehrten Lehrer, dem Direktor des Instituts für Pharmakologie und Toxikologie der Humboldt-Universität zu Berlin, Herrn Professor Dr. F. Jung, meinen Dank aussprechen für die Anregungen und die Unterstützung, die ich während der Durchführung der experimentellen Arbeiten erhalten habe. Gleichfalls danken möchte ich dem Direktor des Instituts für Physiologische Chemie der Humboldt-Universität zu Berlin, Herrn Professor Dr. Rapoport, für seine wertvollen Hinweise während der Durchführung der Untersuchungen und bei der Abfassung der vorliegenden Arbeit.

Nicht vergessen möchte ich aber auch an dieser Stelle, die technische Assistenz von Frl. Ruth Schäfer und Frl. Dorothea Lawrenz zu erwähnen. Ihrer gewissenhaften und verständnisvollen Mitarbeit sei ebenfalls mein Dank ausgesprochen.

Berlin, am 10. Januar 1957

8. Abkürzungen,

die im Text oder in den schematischen Darstellungen und in den Abbildungslegenden Verwendung finden:

ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
BTS	Brenztraubensäure
DOAP	Dioxyazetonphosphat
1,3-DPGS	1,3-Diphosphoglyzerinsäure
2,3-DPGS	2,3-Diphosphoglyzerinsäure
DPN	Diphosphopyridinnukleotid
DPN.H	hydriertes Diphosphopyridinnukleotid
F	Flavinenzym
F.H	hydriertes Flavinenzym
FA	Formaldehyd
F-1,6-DP	Fruktose-1,6-diphosphat
F-6-P	Fruktose-6-phosphat
G	Glukose
GAP	Glyzerinaldehyd-3-phosphat
G-6-P	Glukose-6-phosphat
Hb(T)	Gesamthämoglobin
Hb(2)	Hämoglobin
Hb(3)	Methämoglobin, Hämoglobin
3-K-6-PGlS	3-Keto-6-phosphoglukonsäure
MB	Leukomethylenblau
MB.H	Methylenblau
MS	Milchsäure
PBTS	Phosphobrenztraubensäure
6-PGlS	6-Phosphoglukonsäure
3-PGS	3-Phosphoglyzerinsäure
Rl-5-P	Ribulose-5-phosphat
R-5-P	Ribose-5-phosphat
TPN	Triphosphopyridinnukleotid
TPN.H	hydriertes Triphosphopyridinnukleotid

9. Verzeichnis der Abbildungen

Abb. 1. Methämoglobinrückbildung ohne Substratzugabe
Abb. 2. Methämoglobinrückbildung durch Glukose
Abb. 3. Rückbildungsaktivität und ATP-Gehalt
Abb. 4. Methämoglobinrückbildung durch Glukose und Beschleunigung durch Methylenblau
Abb. 5. Methämoglobinrückbildung durch Glukose und Methylenblau in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Substratzugabe
Abb. 6. Methämoglobinrückbildung in normalen und pathologischen menschlichen Erythrozyten (idiopathische Methämoglobinämie)
Abb. 7. Methämoglobinrückbildung durch Glukose. Fruktose, Manose und Galaktose
Abb. 8. Methämoglobinrückbildung durch Ribose
Abb. 9. Rückbildungsaktivität in den Erythrozyten von 11 verschiedenen Haus- und Laboratoriumstieren
Abb. 10. Reduktion von Kaliumferrizyanid im Außenmedium
Abb. 11. Methämoglobinrückbildung nach Formaldehydbehandlung

Abb. 12. Methämoglobinrückbildung durch Glukose und Laktat nach Formaldehydbehandlung
Abb. 13. Methämoglobinrückbildung nach Formaldehydbehandlung, Abhängigkeit von der Aldehydkonzentration
Abb. 14. Methämoglobinrückbildung durch Formaldehyd
Abb. 15. Methämoglobinrückbildung durch Formaldehyd, Abhängigkeit von der Aldehydkonzentration
Abb. 16. Methämoglobinrückbildung durch verschiedene Aldehyde gleicher Konzentration
Abb. 17. Formaldehydbindung und -verbrauch von Erythrozyten
Abb. 18. Formaldehydverbrauch und Methämoglobinrückbildung
Abb. 19. Papierchromatographische Identifizierung der Salizylsäure als Reaktionsprodukt der Salizylaldehydoxydation
Abb. 20. Wirkung von Glykolysehemmstoffen auf die Methämoglobinrückbildung durch Formaldehyd
Abb. 21. Methämoglobinrückbildung durch Formaldehyd in Gegenwart von Formiat
Abb. 22. Methämoglobinrückbildung durch Formaldehyd in den Erythrozyten verschiedener Tierarten, Abhängigkeit von der Konzentration des Aldehyds
Abb. 23. Methämoglobinrückbildung in Kaninchen- und Rindererythrozyten
Abb. 24. Formaldehydverbrauch von Kaninchen- und Rindererythrozyten
Abb. 25. Oxydation verschiedener Substrate im O_2-Methylenblau-System
Abb. 26. Methämoglobinrückbildung durch Formaldehyd in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Substratzugabe
Abb. 27. Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Substratzugabe
Abb. 28. Methämoglobinrückbildung durch Formaldehyd in Retikulozyten
Abb. 29. Methämoglobinrückbildung im Vollhämolysat
Abb. 30. Methämoglobinrückbildung durch Formaldehyd im Zytoplasma. DPN-Spezifität
Abb. 31. Abhängigkeit der Methämoglobinrückbildung durch Formaldehyd von der DPN-Konzentration
Abb. 32. Methämoglobinrückbildung durch Formaldehyd im Zytoplasma in Abhängigkeit von der Konzentration des Aldehyds
Abb. 33. Oxydation von Xanthin im Zytoplasma
Abb. 34. Aktivitätskurve der Aldehyddehydrase in Abhängigkeit von der Wasserstoffionenkonzentration
Abb. 35. Resistenz der Aldehyddehydrase gegenüber thermischer Schädigung

LITERATUR

1. Abu Fadl, M. A. M., and K. J. King, Biochem. J. **41**, XXXII (1947).
2. Abu Fadl, M. A. M., and K. J. King, J. Clin. Path. **1**, 80 (1948).
3. Abu Fadl, M. A. M., and K. J. King, Biochem. J. **42**, XXVII (1948).
4. Abu Fadl, M. A. M., and K. J. King, Biochem. J. **45**, 51 (1949).
5. Alivisatos, S. G. A., and C. F. Denstedt, Science **114**, 218 (1951).
6. Alexander, N., and D. M. Greenberg, J. Biol. Chem. **214**, 821 (1955).
7. Altmann, K. J., Biochem. a. biophys. Acta **15**, 155 (1954).
8. Ammundsen, E., Science **90**, 327 (1939).
9. Anagnostopoulus, C., Biochem. a. biophys. Acta **4**, 584 (1950).
10. Annison, K. F., Biochem. J. **58**, 670 (1954).
11. Aron, H., Biochem. Z. **3**, 1 (1906).
12. Barron, R. S. G., and G. A. Harrop, J. Biol. Chem. **79**, 65 (1928).
13. Bartlett, G. R., and A. A. Marlow, J. appl. Physiol. **6**, 335 (1953).
14. Bernheim, F., P. S. K. M. **79**, 133 (1951).
15. Bird, R. M., J. Biol. Chem. **169**, 493 (1947).
16. Black, S., Arch. biochem. a. biophysics **34**, 86 (1951).
17. Blanchaer, M. C., R. R. Williams and P. Weiss, Amer. J. Physiol. **181**, 602 (1955).
18. Blanchaer, M. C., S. Brownstone, and H. R. Williams, Amer. J. Physiol. **183**, 95 (1955).
19. Poszormenyi-Nagy, I., J. Biol. Chem. **212**, 495 (1955).
20. Brooks, J., Proc. Royal Soc. (Lond.) B **109**, 35 (1938).
21. Brooks, J., Proc. Royal Soc. (Lond.) B **119**, 560 (1955).
22. Brouwer, K., and H. J. Nijkamp, Acta physiol. pharmacol. Neerland. **1**, 44 (1950).
23. Bruns, F., Biochem. Z. **325**, 429 (1954).
24. Bruns, F., und Chr. Kirschner, Naturwiss. **41**, 141 (1954).
25. Bruns, F., und K. Vahlhaus, Naturwiss. **43**, 180 (1956).
26. Caputto, R., L. F. Leloir, C. E. Cardini and A. C. Paladini, J. Biol. Chem. **184**, 333 (1950).
27. Caputto, R., L. F. Leloir, R. K. Trucco, C. E. Cardini and A. C. Paladini, J. Biol. Chem. **179**, 497 (1949).
28. Charalampous, F. C., J. Amer. Chem. Soc. **77**, 1391 (1955).
29. Christensen, W. R., C. H. Plimpton and E. G. Ball, J. Biol. Chem. **180**, 791 (1949).
30. Clarkson, K. M., and M. Meisels, J. of Physiol. **166**, 122 (1952).
31. Cox, W. W., and W. B. Wendel, J. Biol. Chem. **143**, 331 (1942).
32. Damble, K., Z. ges. exper. Med. **86**, 594 (1933).
33. Dennig, A., Dtsch. Arch. d. inn. Med. **65**, 524 (1900).
34. Denstedt, O. F., Memoire of the Univ. Laborat. of Physiol. Chem. related to medicine and public health Harvard University **2**, 223 (1953).
35. Dische, Z., Naturwiss. **26**, 252 (1938).
36. Dische, A., Fed. Proc. **5**, 131 (1946).
37. Dittrich, P., Arch. exp. Path. u. Pharmak. **29**, 247 (1892).
38. Doljanski, R., und W. Koch, Virchows Archiv **291**, 379, 401 (1933).
39. Drabkin, D. H., J. Biol. Chem. **182**, 317 (1950).
40. Dreser, H., Arch. exp. Path. u. Pharmak. **1908**, Suppl. 138.
41. Droller, H., Hoppe-Seylers Z. **211**, 57 (1932).
42. Eggleton, P., and G. Fegler, Quart. J. Exp. Physiol. **37**, 163 (1952).
43. Engelhardt, W. A. und M. Ljubimowa, Biochem. Z. **227**, 16 (1930).
44. Evelyn, K. A., and H. T. Malloy, J. Biol. Chem. **126**, 655 (1938).
45. Fegler, G., J. of Physiol. **115**, 123 (1951).
46. Fegler, G., Nature **170**, 624 (1952).
47. Francoeur, zitiert bei Denstedt (34).
48. Garzo, F., A. Ullmann, und F. B. Straub, Acta Physiol. (Ungar.) **3**, 513 (1952).
49. Gibson, Q. H., Biochem. J. **37**, 615 (1943).
50. Gibson, Q. H., Biochem. J. **42**, 13 (1948).
51. Gordon, J. J., Biochem. J. **46** 96 (1950).
52. Golden, R., and F. Sargent, Arch. Biochem. a. Biophysics **39**, 138 (1952).
53. Gould, B. S., J. Biol. Chem. **156**, 365 (1944).
54. Granick, S., Blood **4**, 404 (1949).
55. Guest, G. M., and S. Rapoport, J. Biol. Chem. **123**, XIVII (1938).
56. Guthe, K. K., J. Gen. Physiol. **37**, 775 (1954).
57. Gutmann, H. R., B. J. Jandorf and B. Bodansky, J. Biol. Chem. **169**, 145 (1947).
58. Harrop, G. A., and Barron, E. S. G., J. exp. Med. (Am.) **48**, 207 (1928).
59. Harrop, G. A., and Barron, K. S. G., J. Biol. Chem. **81**, 445 (1929).
60. Haurowitz, F., Hoppe-Seylers Z. **138**, 68 (1924).
61. Haurowitz, F., Hoppe-Seylers Z. **138**, 89 (1924).
62. Havemann, R., F. Jung und B. v. Issekutz, Biochem. Z. **311**, 116 (1939).
63. Hecht, G., zitiert bei Heubner (68).
64. Herbert, E., J. Coll. a. Comp. Physiol. **47**, 11 (1956).
65. Heubner, W., Dtsch. med. Wschr. **1911**, II, 2402.
66. Heubner, W., und H. Rhode, Arch. exp. Path. u. Pharmak. **100**, 126 (1923).
67. Heubner, W., Erg. Physiol. **43**, 9 (1940).
68. Heubner, W., Klin. Wschr. **19**, 328 (1940).

69. Heubner, W., und F. Jung, Schweizer Med. Wschr. **1941**, I, 247.
70. Heubner, W., M. Kiese, M. Stuhlmann und W. Schwartzkopff-Jung, Arch. exp. Path. u. Pharmak. **204**, 313 (1947).
71. Hevesy, G., and L. Hahn, Kgl. Danske Videnske Selsk. **15**, 7 (1940).
72. Hift, H., and H. R. Mahler, J. Biol. Chem. **198**, 901 (1952).
73. Hill, R., and H. F. Holden, Biochem. J. **21**, 625 (1927).
74. Hof, J., und I. Woller, Klin. Wschr. **1956**, 98.
75. Hofmann, K. C. G., und S. Rapoport, Biochem. Z. **326**, 499 (1955).
76. Hofmann, K. C. G., Biochem. Z. **327**, 273 (1955).
77. Hofmann, K. C. G., und S. Rapoport, Biochem. Biophys. Acta **18**, 296 (1955).
78. Holden, H. F., Biochem. J. **19**, 727 (1925).
79. Hoppe-Seylers, Zbl. Med. Wissensch. **2**, 261 (1864).
80. Hoppe-Seylers, Zbl. Med. Wissensch. **3**, 366 (1865).
81. Horecker, B. L., P. Z. Smyrniotis and J. E. Seegmiller, J. Biol. Chem. **193**, 371 (1951).
82. Horecker, B. L., P. Z. Smyrniotis and J. E. Seegmiller, J. Biol. Chem. **193**, 383 (1951).
83. Hörlein, H., und G. Weber, Dtsch. Med. Wschr. **73**, 476 (1948).
84. Huennekens, F. M., R. K. Basford and B. W. Gabrio, J. Biol. Chem. **213**, 951 (55).
85. Iselbacher, K. J., K. P. Anderson, K. Kurahoshi and H. M. Kalckar, Science **123**, 635 (1956).
86. Issekutz jr., B. v., Arch. exp. Path. u. Pharmak. **193**, 551 (1939).
87. Issekutz jr., B. v., Arch. exp. Path. u. Pharmak. **193**, 567 (1939).
88. Issekutz jr., B. v., Arch. exp. Path. u. Pharmak. **193**, 168 (1944).
89. Jung, F., Klin. Wschr. **19**, 1016 (1940).
90. Jung, F., Verhdlg. Dtsch. Ges. f. Inn. Med. 54. Kongr. **1948**.
91. Jung, F., Dtsch. Ges.-wes. **6**, 868 (1951).
92. Jung, F., und R. Kuon, Arch. exp. Path. u. Pharmak. **214**, 103 (1951).
93. Jung, F., H. Matthies und K. Onnen, Arch. exp. Path. u. Pharmak. **222**, 474 (1954).
94. Jung, F., und K. Onnen, Arch. exp. Path. u. Pharmak. **224**, 179 (1955).
95. Kallner, S., Acta med. Scand. Suppl. **130**, 1100 (1942).
96. Kallner, S., J. of Physiol. **104**, 6 (1945).
97. Kesser, E., und E. Vincke, Klin. Wschr. **19**, 563 (1940).
98. Kendal, L. P., and A. N. Ramanathan, Biochem. J. **54**, 424 (1953).
99. Kiese, M., und B. Weis, Arch. exp. Path. u. Pharmak. **202**, 493 (1943).
100. Kiese, M., Biochem. Z. **316**, 264 (1944).
101. Kiese, M., Klin. Wschr. **24/25**, 81 (1946).
102. Kiese, M., und W. Schwartzkopff, Arch. exp. Path. u. Pharmak. **204**, 267 (1947).
103. Kiese, M., Arch. exp. Path. u. Pharmak. **204**, 288 (1947).
104. Kiese, M., Arch. exp. Path. u. Pharmak. **204**, 451 (1947).
105. Kiese, M., Arch. exp. Path. u. Pharmak. **207**, 99 (1949).
106. Kiese, M., und C. Schneider, Biochem. Z. **326**, 209 (1955).
107. Künzer, W., Zschr. ges. exp. Med. **124**, 465 (1954).
107a. Lang, K., Der intermediäre Stoffwechsel, Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg (1952).
108. Leder, I., and P. Nandler, Phosphorus Metabolism 1, Baltimore 1951.
109. Leder, I., and P. Nandler, J. Biol. Chem. **189**, 2 (1951).
110. Leutz, K., and H. G. Wood, J. Biol. Chem. **215**. 645 (1955).
111. Lohmann, K., und O. Meyerhof, Biochem. Z. **273**, 60 (1934).
112. Mackenzie, C. G., J. P. Chandler, E. B. Keller, J. R. Rachele, N. Cross and V. du Vigneaud, J. Biol. Chem. **180**, 99 (1949).
113. Mackenzie, C. G., J. Biol. Chem. **186**, 351 (1950).
114. Mackenzie, C. G., J. M. Johnston and W. R. Frisell, J. Biol. Chem. **203**, 743 (1953).
114a. Malkin, A., and O. F. Denstedt, Canad. J. Biochem. Physiol. **34**, 141 (1956).
115. Mann, P. J. Q., and J. H. Quastal, Biochem. J. **35**, 502 (1941).
116. Manyai, S., und M. Szekely, Acta Physiol. (Budapest) **5**, 7 (1954).
117. Marshall, W., J. Biol. Chem. **158**, 187 (1945).
118. Matthies, H., Arch. exp. Path. u. Pharmak. **226**, 442 (1955).
119. Matthies, H., K. Onnen und F. Jung, Dtsch. Ges.-wes. **8**, 1562 (1953).
120. Matthies, H., Arch. exp. Path. u. Pharmak. **221**, 497 (1953).
121. Matthies, H., F. Jung und R. Schäfer, ebenda **225**, 352 (1955).
122. Matthies, H., Arch. exp. Path. u. Pharmak. **229**, 331 (1956).
122a. Matthies, H., Arch. exp. Path. u. Pharmak. **228**, 241 (1956).
122b. Matthies, H., Naturwiss. **43**, 200 (1956).
123. Meier, R., Arch. exp. Path. u. Pharmak. **110**, 241 (1925).
124. Meldrum, N. U., and H. C. A. Tarr, Biochem. J. **29**, 108 (1935).
125. Michaelis, L., Biochem. Z. **239**, 186 (1931).
126. Michaelis, L., and K. Salomon, P. S. E. B. M. **28**, 966 (1930/31).
127. Michaelis, L., and K. Salomon, J. Gen. Physiol. **13**, 683 (1930).
128. Michaelis, L., and K. Salomon, Biochem. Z. **234**, 107 (1931).
129. Morimura, S., ref. Ber. ges. exp. Path. u. Pharmak. **180**, 117 (1956).
130. Morrison, D. B., and H. R. Williams, Science **87**, 15 (1938).
131. Moser, P., Arch. exp. Path. u. Pharmak. **210**, 60 (1950).
132. Naganna, B., J. Biol. Chem. **183**, 693 (1950).
133. Nash, T., Biochem. J. **55**, 416 (1953).
134. Nygaard, A. P., and J. B. Sumner, Arch. biochem. biophysics **39**. 119 (1952).
135. Paul, W. D., and C. R. Kemp, P. S. E. B. M. **56**, 55 (1944).
136. Paysant, P., Dissertation Nancy **1952a**.
137. Paysant, P., et R. Wolff., C. rend. Soc. biol. Paris **146**, 1253 (1952).
138. Paysant, P., et R. Wolff, C. rend. Soc. biol. Paris **146**, 1250 (1952).
139. Peters, J., and D. D. van Slyke, Quant. Clin. Chem. Vol. I (1946).
140. Pohl, J., Arch. exp. Path. u. Pharmak. **31**, 281 (1893).
141. Ponder, E., J. Gen. Physiol. **29**, 89 (1945).
142. Quastel, J. H., and A. H. M. Wheatley, Biochem. **25**, 117 (1931).
143. Quastel, J. H., and A. H. M. Wheatley, Biochem. J. **32**, 936 (1938).
144. Racker, K., J. Biol. Chem. **177**, 883 (1949).
145. Ramsay, R., and C. O. Warren, Quart. J. exp. Physiol. **20**, 213 (1928).
146. Ramsay, R., and C. O. Warren, Quart. J. exp. Physiol. **22**, 49 (1933).
147. Ramsay, W. M. N., Biochem. J. **38**, 470 (1944).
148. Rapoport, S. M., and G. M. Guest, J. Biol. Chem. **138**, 269 (1940).
149. Rapoport, S., and J. Luebering, J. Biol. Chem. **183**, 507 (1950).
150. Rapoport, S., and J. Luebering, J. Biol. Chem. **189**, 683 (1951).
151. Rapoport, S., and J. Luebering, J. Biol. Chem. **196**, 583 (1952).
152. Rapoport, S., J. Luebering und R. H. Wagner, Hoppe-Seylers Z. **302**, 105 (1955).
153. Rapoport, S., und C. Nieradt, Biochem. Z. **326**, 231 (1955).
154. Reinbold, V., Hoppe-Seylers Z. **85**, 250 (1913).
155. Roughton, F. J. W., R. C. Darling and W. S. Root, Am. J. Physiol. **142**, 708 (1944).
156. Roche, A., et J. Roche, Bull. Soc. Chim. Biol. **15**, 520 (1933).

157. Rubinstein, D., P. Ottolengi and O. F. Denstedt, Canad. J. Biochem. Physiol. **34**, 222 (1956).
158. Sakurai, K., Arch. exp. Path. u. Pharmak. **107**, 278 (1925).
159. Schapott, W. S., Biochimija **3**, 38 (1938).
160. Schapott, W. S., Biochimija **3**, 430 (1938).
161. Schmid, D., and D. Shemin, J. Amer. Chem. Soc. **77**, 506 (1955).
162. Schmid-Burgk, zit. bei Heubner (67).
163. Schmitz, H., and C. Glover, J. Biol. Chem. **74**, 761 (1927).
164. Schneider, D., W. Künzer und E. Aubs, Z. ges. exp. Med. **122**, 90 (1953).
164a. Scheler, W., K. Scheler und F. Jung, Biochem. Z. **326**, 295 (1955).
165. Schwarz, V., L. Golberg, G. M. Kornrover and A. Holzel, Biochem. J. **62**, 34 (1956).
166. Seegmiller, J. E., J. Biol. Chem. **201**, 629 (1953).
167. Seegmiller, J. E., and B. L. Horecker, J. Biol. Chem. **194**, 261 (1952).
168. Seligman, A. M., H. H. Chauncey and N. N. Nachlas, Stain Techn. **26**, 19 (1951).
169. Shemin, D.: J. Biol. Chem. **162**, 297 (1946).
170. Shemin, D., I. London and Rittenberg, Chem. **183**, 757 (1950).
171. Shemin, D., I. London and D. Rittenberg, J. Biol. Chem. **183**, 767 (1950).
172. Shemin, D., and J. Wittenberg, J. Biol. Chem. **192**, 315 (1951).
173. Shemin, D., and S. Kumin, J. Biol. Chem. **198** 827 (1952).
174. Shemin, D., C. S. Russel and T. Abramsky, J. Biol. Chem. **215**, 613 (1955).
175. Siekevitz, Ph., and D. M. Greenberg, J. Biol. Chem. **180**, 845 (1949).
176. Siekevitz, Ph., and D. M. Greenberg, J. Biol. Chem. **186**, 275 (1950).
176a. Sievers, R., and J. Ryon, Arch. intern. Hed. **76**, 299 (1946).
177. Solvonuk, P. F., and H. B. Collier, Canad. J. Biochem. Physiol. **33**, 38 (1955).
178. Somogyi, M.: J. Biol. Chem. **103**, 665 (1933).
179. Spicer, S. S., and A. M. Clark, J. Biol. Chem. **179**, 987 (1949).
180. Spicer, S. S., C. H. Hannah and A. M. Clark, J. Biol. Chem. **177**, 217 (1949).
180a. Strittmater, Ph., and M. G. Ball, J. Biol. Chem. **213**, 445 (1955).
181. Steppuhn, D., und H. Schellbach, Hoppe-Seylers Z. **80**, 274 (1912).
182. Szekely, M., S. Manyai und F. B. Straub, Acta Physiol. (Budapest) **4**, 31 (1952).
183. Taxi, J., J. de Physiol. **44**, 595 (1952).
184. Trucco, R. K., R. Caputto, L. F. Leloir and N. Mittelmann, Biochem. J. **44**, 460 (1949).
185. Van Slyke, D. D., A. Hiller, J. R. Weisiger and W. O. Cruz, J. Biol. Chem. **166**, 121 (1946).
186. Vestling, C. S., J. Biol. Chem. **140**, 135 (1941).
187. Wajzen, J., Bull. Soc. Chim. Biol. **53**, 1353 (1951).
188. Wajzen, J., Bull. Soc. Chim. Biol. **45**, 51 (1949).
189. Warburg, O., Hoppe-Seylers Z. **59**, 12 (1909).
190. Warburg, O., Biochem. Z. **310**, 384 (1941).
191. Warburg, O., Wasserstoff-übertragende Fermente, Berlin **1948**.
192. Warburg, O. und F. Kubowitz, Biochem. Z. **221**, 494 (1930).
193. Warburg, O., F. Kubowitz und W. Christian, Biochem. Z. **227**, 245 (1930).
194. Warburg, O., F. Kubowitz und W. Christian, Biochem. Z. **242**, 170 (1931).
195. Warburg, O. und W. Christian: Biochem. Z. **238**, 131 (1931).
196. Warburg, O., F. Kubowitz und W. Christian, Biochem. Z. **233**, 140 (1931).
197. Warburg, O., F. Kubowitz und W. Christian, Biochem. Z. **234**, 107 (1931).
198. Warburg, O., F. Kubowitz und W. Christian, Biochem. Z. **242**, 206 (1931).
199. Watts, D. T., Arch. Biochem. Biophysics **34**, 391 (1951).
200. Wendel, W. B., P. S. E. B. M. **26**, 865 (1929).
201. Wendel, W. B., P. S. E. B. M. **27**, 624 (1930).
202. Wendel, W. B., and P. A. Shaffer, J. Biol. Chem. **87**, XX (1930).
203. Wendel, W. B., and P. A. Shaffer, Proc. Soc. Biol. Chem. **7**, 20 (1930).
204. Wendel, W. B., P. S. E. B. M. **28**, 401 (1931).
205. Wendel, W. B., J. Biol. Chem. **102**, 373 (1932).
205a. Wendel, W. B., J. Biol. Chem. **102**, 385 (1932).
206. Werle, E., F. Turtur, und R. Bauereis, Biochem. Z. **319**, 337 (1949).
207. Wilbrandt, W., und H. U. Wyss, Helvet. Physiol. Acta **5**, 457 (1947).
208. Wright, G. P., J. Gen. Physiol. **14**, 179 (1931).
209. Zeile, K., und H. v. Kuler, Hoppe-Seylers Z. **195**, 35 (1931).
210. Zipf, H. F., Arch. exp. Path. u. Pharmak. **206**, 225 (1949).

(Eingegangen: 8. 6. 1957)

Zusammenfassung

HANSJÜRGEN MATTHIES:

Untersuchungen über die Methämoglobinrückbildung und über eine Aldehyddehydrase in kernlosen Erythrozyten

In der vorliegenden Arbeit werden die Untersuchungen anderer Autoren über die Methämoglobinreduktion in kernlosen roten Blutzellen überprüft und durch weitere Befunde ergänzt. Es zeigte sich, daß neben Glukose und Laktat auch Mannose, Galaktose und Ribose als Substrate der Rückbildungsvorgänge dienen können. Offenbar sind aber an der Methämoglobinrückbildung durch Ribose noch andere Enzymsysteme beteiligt, als an derjenigen durch die Hexosen.

Die Differenzierung der DPN- und TPN-abhängigen Rückbildungsprozesse ließ erkennen, daß für beide Arten unterschiedliche Wasserstoffüberträger vom Pyridinnukleotid auf das Methämoglobin angenommen werden müssen. Die zum Teil abweichenden Ergebnisse anderer Autoren werden darauf zurückgeführt, daß Erythrozyten verschiedener Tierarten verwandt wurden. Der Vergleich der Rückbildungssysteme in den Erythrozyten von 11 Haus- und Laboratoriumstieren ließ recht erhebliche Unterschiede der Aktivitäten der einzelnen Systeme erkennen.

Bei der Untersuchung der Wirkung von Formaldehyd auf die Struktur und den Stoffwechsel der kernlosen roten Blutkörperchen konnte das Vorhandensein einer Aldehyddehydrase in diesen Zellen sichergestellt werden. Das Enzym ist DPN-spezifisch und vermag aliphatische und aromatische Aldehyde zu den entsprechenden Säuren zu oxydieren. Nicht alle Tierarten enthalten in ihren Erythrozyten diese Aldehyddehydrase, die höchste Aktivität konnte in den roten Blutzellen des Kaninchens gemessen werden. Die Eigenschaften der Aldehyddehydrase in Kaninchenerythrozyten wurden genauer untersucht. Unter Berücksichtigung der Ergebnisse anderer Autoren wird die mögliche Bedeutung des Enzyms diskutiert.

Гансюрген Маттис:

Расследования регресса метемоглобина и дегидразы алдегида в безъядерных эротроцитах

В данной работе автор подвергает проверке расследования других авторов, касающиеся редукции метемоглобина в безъядерных красных шариках крови и дополняет имеющиеся познания рядом новых результатов. Оказывается, что наряду с глюкозой и лактатом для регрессивных процессов метемоглобина, как субстраты, могут служить также манноза, галактоза и рибоза. Регрессивные процессы метемоглобина могут быть вызваны как рибозою, так и гексозою, однако действуют в этих регрессивных процессах очевидно разные энзимные системы.

Эта дифференциация зависимых от ДПН и ТПН регрессивных процессов принуждает нас предполагать, что для каждого из них необходимы различные переносители водорода с перединуклеотида на метемоглобин. Частичное несогласование с результатами других авторов объясняется тем, что они для своих экспериментов употребляли эротроциты разных животных. Сравнивая регрессивные системы в эротроцитах 11 домашних и лабораторных животных, можно было установитв значительное различие активности отдельных систем.

При расследовании действия формалдегида на обмен веществ и структуру безъядерных красных шариков крови, можно было установить в этих клетках наличие дегидразы алдегида. Энзим — ДПН специфичен и способен оксидировать жирные и ароматические алдегиды в соответствующую кислоту. Не у всех животных эротроциты содержут эту дегидразу алдегида, самая большая активность замечена в красных кровяных клетках кролика. Точней были исследованы свойства дегидразы алдегида в эротроцитах кролика. Принимая во внимание выводы других авторов, дискутируется всевозможное значение энзима.

Hansjürgen Matthies:

Research on methaemoglobin-reduction and an aldehyddehydrogenase in erythrocytes without nucleus

In the work in question the research of other authors on methaemoglobin-reduction in red blood-cells without nucleus is revised and completed by further findings. It appeared that besides glucose and lactat, mannose, galactose and ribose also can be used as substrate for the reduction process. Evidently other enzyme systems have a share in methaemoglobin-reduction using ribose than in that using hexoses.

The differentiation of the DPN- and TPN-dependent reduction processes demonstrates that different hydrogene carriers from pyridinnucleotid to methaemoglobin must be supposed for the two kinds. The partly varying results of other authors are traced back to the fact that erythrocytes of different animal species were used. A comparison of the reduction system in the erythrocytes of eleven domestic and laboratory animals demonstrates quite considerable differences in the activities of the individual systems.

During the research into the effect of formaldehyd on the structure and metabolism of red blood corpuscles without nucleus the presence of an aldehyddehydrogenase in these cells is secured. The enzyme is DPN-specific and is able to oxidate aliphatic and aromatic aldehyds into the corresponding acids. Not all animal species contain this aldehyddehydrogenase in their erythrocytes. The highest activity was measured in the red blood-cells of rabbits. The peculiaritis of aldehyddehydration in the rabbit's erythrocytes were investigated in more detail. In the light of the results gained by other authors the possible importance of the enzyme is discussed.

Hansjürgen Matthies:

Recherches faites au sujet de la reduction de la méthémoglobine et d'une déhydrase d'aldehyde dans les hématies sans noyau

Dans l'étude présente, on examine les recherches que d'autres auteurs ont faites au sujet de la reduction dans les hématies sans noyau. De plus, on les complète par des résultats supplémentaires. Il s'est montré que la mannose, la galactose et la ribose peuvent servir de substratus aux phénomènes de la reduction aussi bien que la glucose et le lactate. Selon toute évidence, la reduction de la méthémoglobine par ribose nécessite encore d'autres systèmes d'enzymes que ceux qui jouent un rôle dans la reduction par hexose.

La différenciation des routes de la reduction dépendants de DPN et TPN fit reconnaître qu'il faut tenir compte, pour les deux espèces de procédés, de deux transmetteurs d'hydrogène différents transmettant l'hydrogène du nucléotide de pyridine à la méthémoglobine. On explique les résultats partiellement divergeants des autres auteurs par ce que l'on y avait employé des hématies appartenant à des espèces d'animaux différents. Le parallèle établi pour des systémes de reduction dans les hématies appartenant à 11 animaux domestiques fit reconnaitre des différences considérables en ce qui concerne l'activité des différents systèmes.

Examinant l'effet que l'aldéhyde formique exerce sur la structure et sur les échanges organiques des hématies sans noyau, on pouvait prouver l'existence d'une déhydrase d'aldéhyde dans ces globules du sang. L'enzyme est spécifiquement dépendante de DPN. Elle est susceptible de transformer par voie d'oxydation les aldéhydes aliphatiques et aromatiques en des acides relatifs. Il y a des espèces d'animaux où cette déhydrase d'aldéhyde n'existe pas dans les hématies. L'activité la plus grande pouvait être trouvée dans les hématies du lapin. Les propriétés de la déhydrase d'aldéhyde dans les hematies des lapins furent examinées de façon plus précise. L'auteur finit par discuter l'importance possible de l'enzyme en tenant compte des résultats obtenus par d'autres auteurs.